

Principales techniques utilisées en génie génétique

Ces différentes techniques peuvent également se combiner entre elles

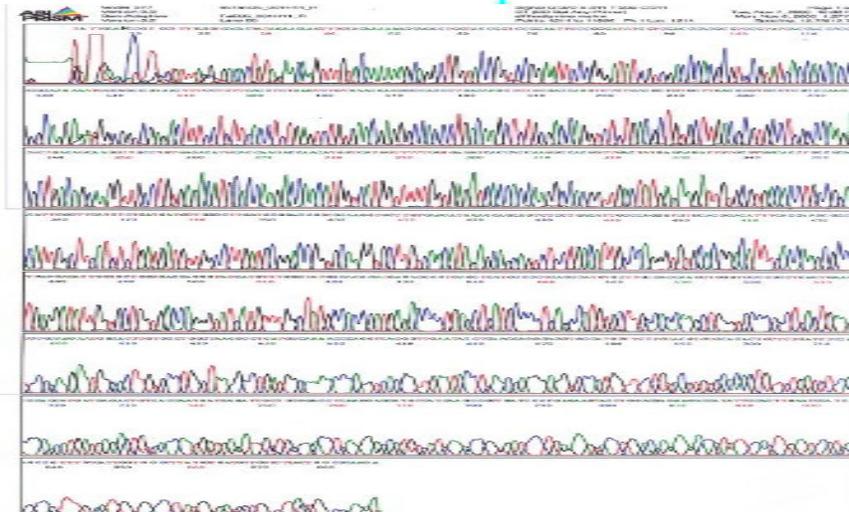
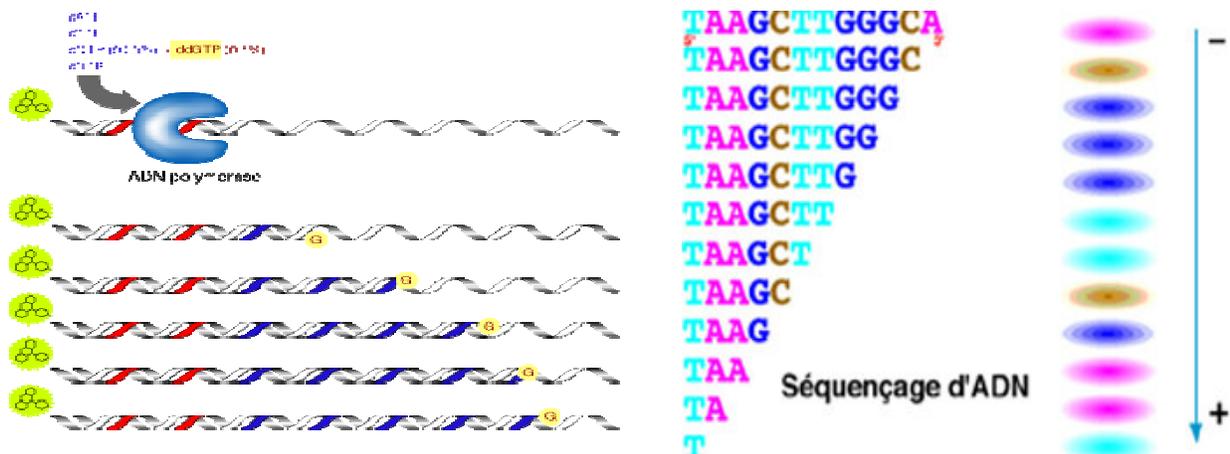
Séquençage de l'ADN

Principe

- 1- Un brin complémentaire de l'ADN à séquencer est fabriqué à partir de nucléotides normaux et de quelques nucléotides modifiés et rendus fluorescents (4 teintes différentes) qui bloquent l'élongation de la séquence (l'ADN polymérase s'arrête à leur niveau)
- 2- On obtient ainsi un grand nombre de brins d'ADN de taille croissante et qui se terminent soit par un ATC ou G fluorescent
- 3- Ces différents fragments sont séparés par électrophorèse.
- 4- Le gel est lu par un faisceau laser qui trace la succession des différents fragments de taille croissante et de couleur différentes
- 5- Un ordinateur associe la séquence des nucléotides en « lisant » la succession des 4 types de fluorescence.

Applications

- Séquençage d'une portion limitée d'ADN comme un gène ou d'un génome entier (le séquençage du génome humain est déjà réalisé)
- Utilisation pour comparer des ADN dans des recherches de paternité ou identification d'individus lors d'enquêtes policières



Electrophorèse

Principe

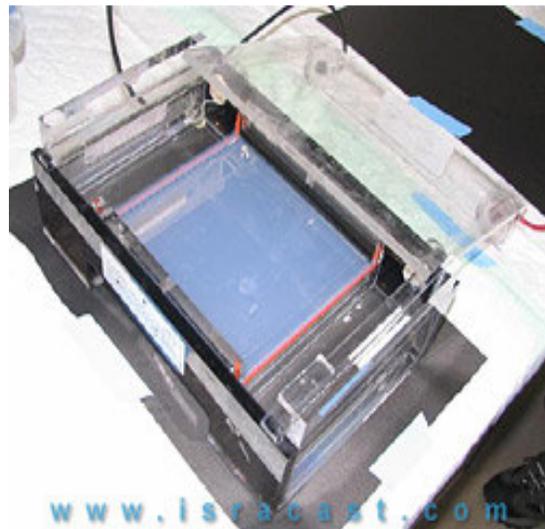
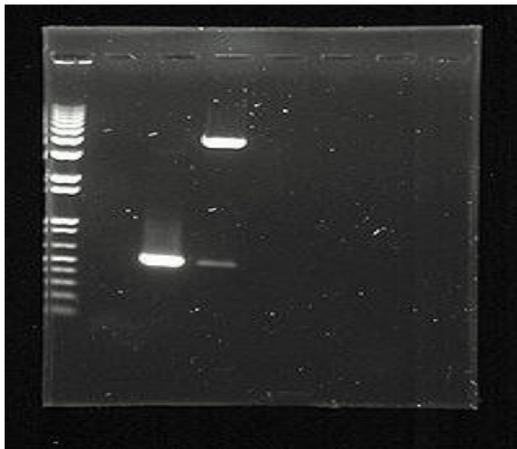
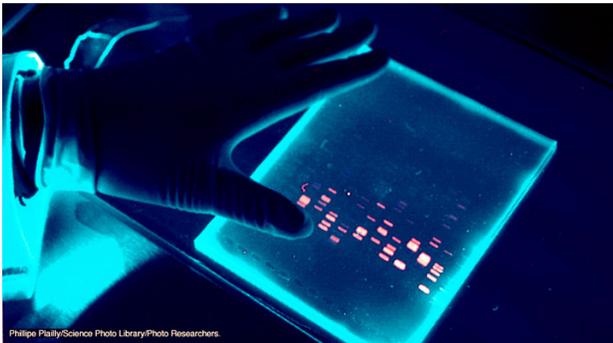
Séparation de molécules, en général des protéines, fragments d'ADN ou d'ARN en fonction de leur charges électriques mais surtout de leur taille : ces molécules vont migrer plus ou moins loin sur leur support (souvent un gel). Les molécules les plus grosses, étant plus freinées par le support, vont migrer moins loin. Ces molécules étant chargées négativement, elles migrent du pôle - vers le pôle +.

Ces molécules n'étant pas colorées naturellement, il faudra les faire « apparaître » sur le support par différentes méthodes (colorant spécifique, fluorescence, autoradiographie, observation sous UV).

Une migration témoin avec des molécules de masses moléculaires connues permet également de déterminer la masse moléculaire des molécules étudiées (voir deuxième document)

applications

Toutes les applications qui demandent une séparation des molécules : séparation des protéines d'un mélange, séparation des acides aminés d'une protéine, identification de segments d'ADN différents...



PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

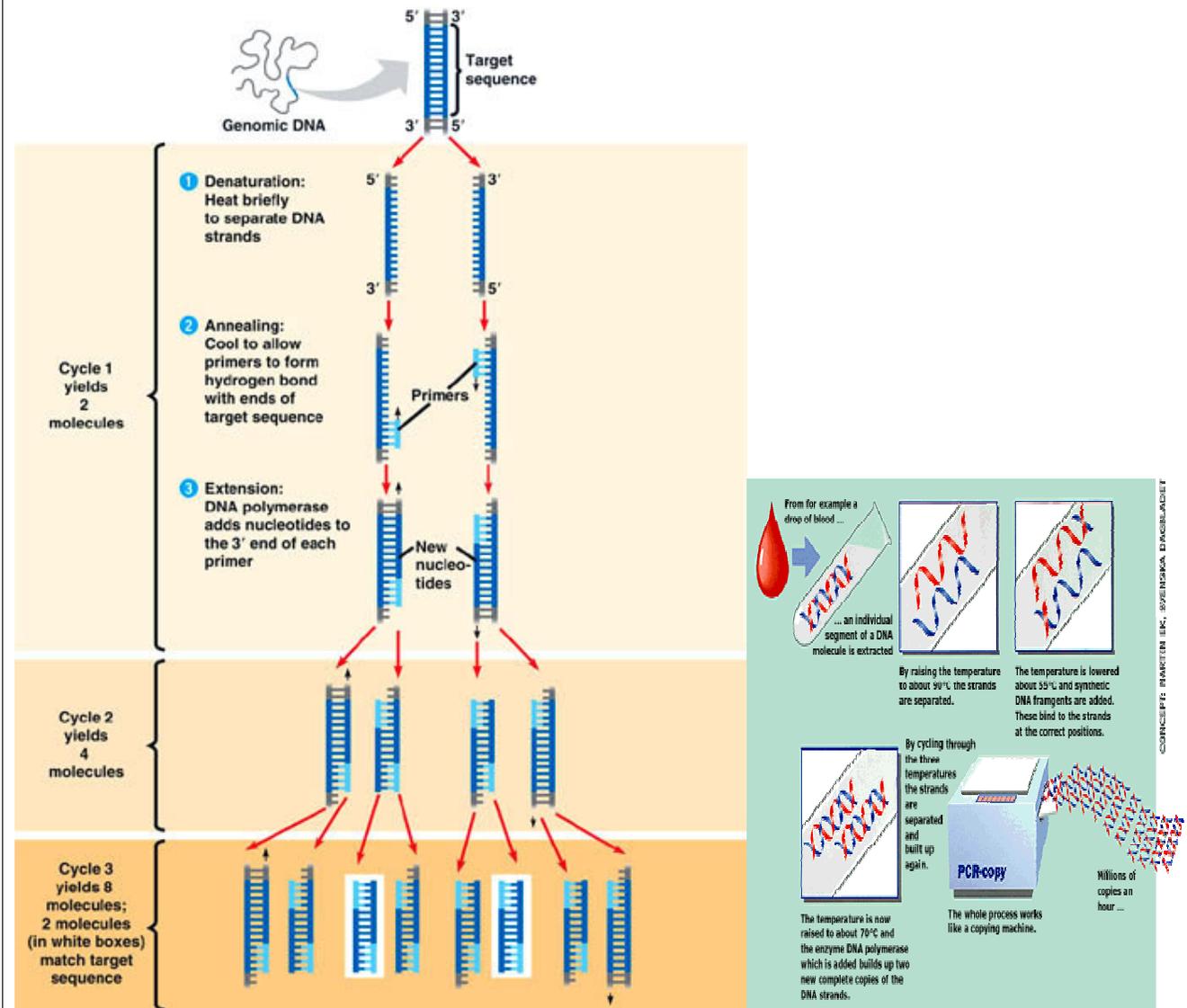
Principe

C'est une technique fondamentale dans la génétique moderne : elle permet de multiplier à l'identique et en très grand nombre un fragment d'ADN que l'on veut étudier (le fragment en bleu dans le schéma ci-dessous). Elle se réalise en trois cycles après avoir dénaturé l'ADN total afin de séparer ses deux brins :

- 1^{er} cycle : mise en place d'amorces complémentaires des deux extrémités de la portion d'ADN à « photocopier ». L'ADN polymérase va reconnaître ces amorces et fabriquer deux ADN double brins dans le sens 3'/5'
- En répétant cette opération une seconde puis une troisième fois à partir de ces deux molécules d'ADN (donc trois cycles en tout), on obtient 8 molécules d'ADN dont deux font exactement la taille et sont exactement identiques à la séquence désirée. En répétant ces trois cycles un très grand nombre de fois (mais ces réactions de polymérisation sont très rapides), on obtient un très grand nombre de copies de cette séquence.

applications

Toutes les applications qui demandent un grand nombre de molécules d'ADN, c'est donc une étape préalable pour pouvoir appliquer ensuite d'autres techniques.



Southern blot, Northern blot, Western blot

Principe

Le *Southern blot* est une technique mise au point par Edward M. Southern en 1975 pour rechercher des fragments d'ADN sur une électrophorèse

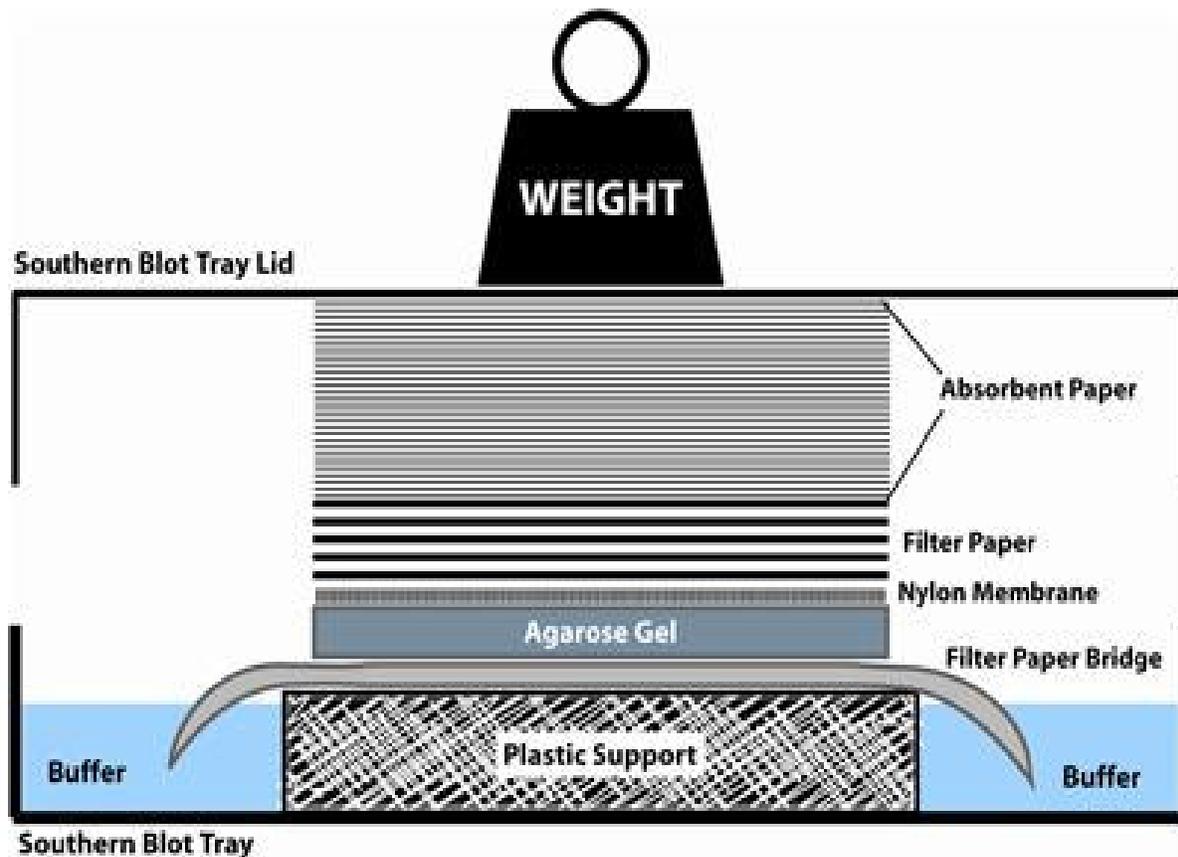
Après une électrophorèse sur gel, l'ADN n'est pas très manipulable du fait de la consistance du gel : l'idée est donc de transférer ces fragments d'ADN sur un support solide auquel ils seront fixés de manière stable et surtout dans la même disposition que sur le gel de départ (une membrane de nylon par exemple).

Le principe est relativement simple : on absorbe par capillarité une solution tampon (buffer) qui en remontant va traverser le gel et entraîner verticalement avec elle les différents fragments d'ADN séparés par électrophorèse. Ces fragments ne pourront pas traverser la membrane de nylon et y resteront fixés.

Après l'ADN, cette technique a été appliquée à des électrophorèses d'ARN (northern blot) et de protéines (western blot)

applications

C'est une technique qui permet ensuite de travailler plus facilement sur les fragments d'ADN en les hybridant par exemple avec des sondes spécifiques (voir électrophorèse + autoradiographie)



Marquage de molécules

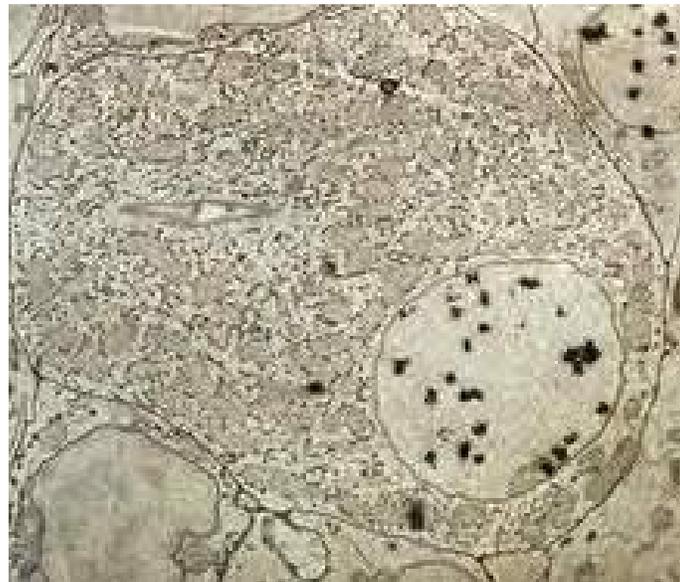
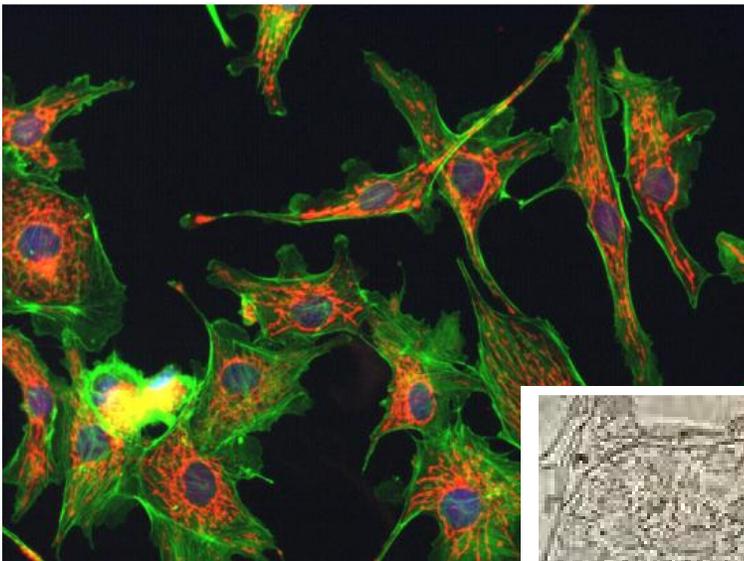
Principe

Les molécules ne sont pas visibles directement (à part les pigments) donc il faut les rendre visibles. Pour cela deux techniques principales :

- le marquage par des isotopes radioactifs (observation possible après autoradiographie) : les plus utilisés sont le P32 pour les acides nucléiques, le S35 pour les protéines et également le H3
- le marquage par fluorescence (observation directe) avec une molécule fluorescente qui se fixe sur une structure précise.

applications

Localisation de molécules ou de structures dans la cellule, suivi du trajet d'une substance dans l'organisme...



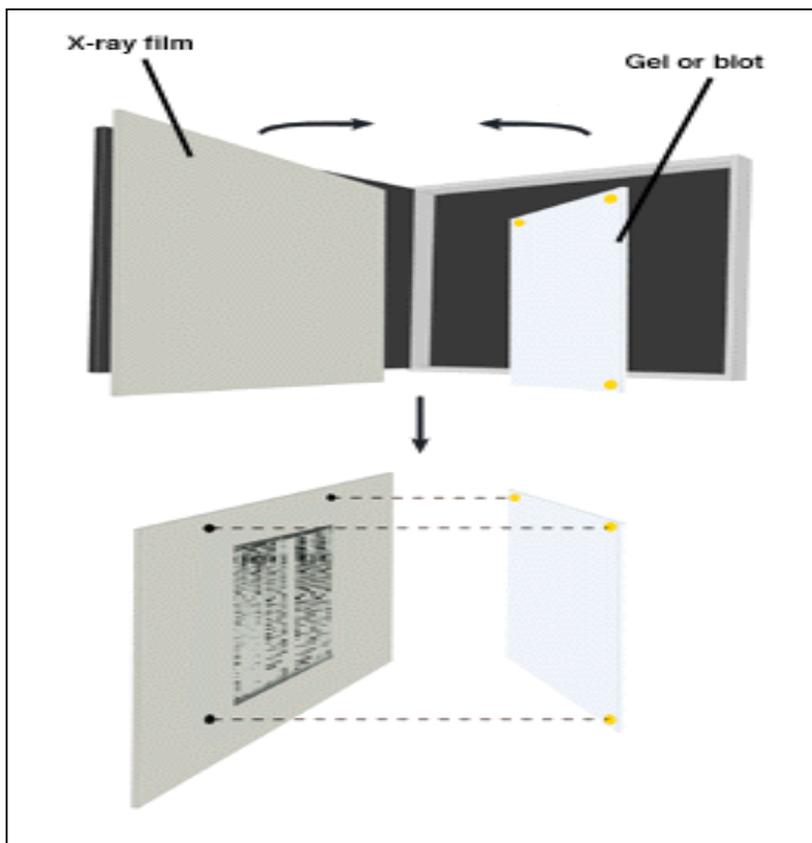
Autoradiographie

Principe

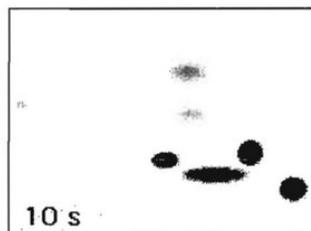
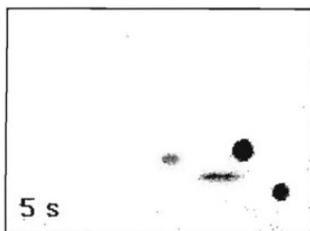
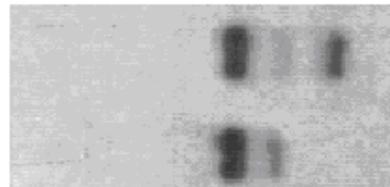
Cette technique permet de faire apparaître la radioactivité de structures qui ont été préalablement marquées par des isotopes radioactifs. La structure marquée (organisme, cellule, molécules...) est mise en contact dans une boîte avec un film sensible aux radiations : les radiations qu'elle émet vont aller imprimer le film et y faire apparaître des tâches noires. Ces tâches vont ainsi permettre de localiser la structure recherchée.

applications

Repérage de molécules sur des organismes entiers, ou sur un support après électrophorèse ou chromatographie (voir documents)



A
TBG TBPA



Enzymes de restriction

Principe

Les enzymes de restriction découvertes chez les bactéries , mais absentes chez la majorité des animaux et végétaux sont des ciseaux moléculaires . Elles sont naturellement produites par les bactéries pour se défendre contre l'infection virale .

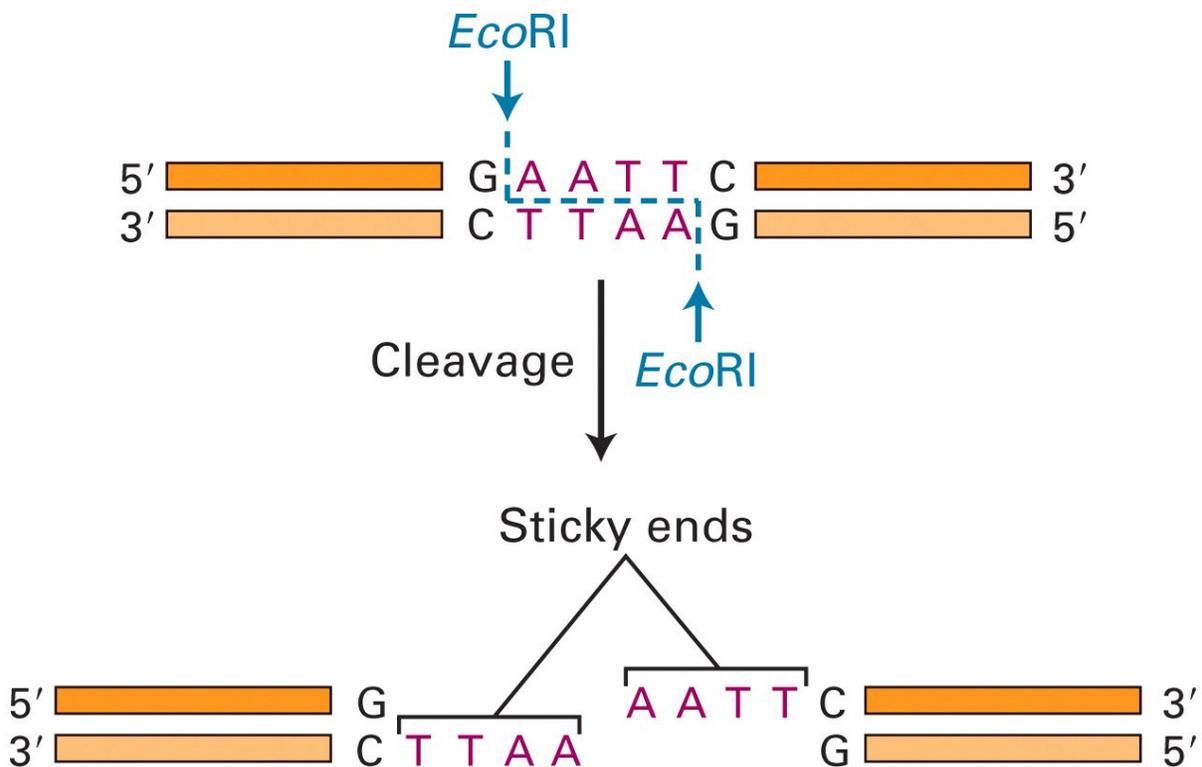
Une enzyme de restriction reconnaît une séquence spécifique et palindromique de quelques nucléotides dans l'ADN de n'importe quelle espèce et le coupe à ce niveau : voir ci-dessous l'action de l'enzyme EcoRI

Ainsi une molécule d'ADN peut être découpée en plusieurs fragments , dans lesquels il est plus facile par exemple de repérer un gène .

La séquence reconnue et sa longueur varient d'une enzyme à l'autre . On dispose ainsi d'une vaste panoplie de ciseaux moléculaires précis et spécifiques

applications

- Découpage de l'ADN à des endroits précis
- Mise en évidence de mutations : les mutations changent la séquence de l'ADN et peuvent donc faire apparaître un nouveau site de restriction ou en faire disparaître un qui existait. Les brins d'ADN découpés qui en résultent seront donc de taille différentes et repérables par électrophorèse.
- Insertion d'un nouveau gène dans un génome grâce aux « bouts collants » (sticky ends) générés par ces enzymes : voir la fiche « création d'OGM »



Clonage de gènes

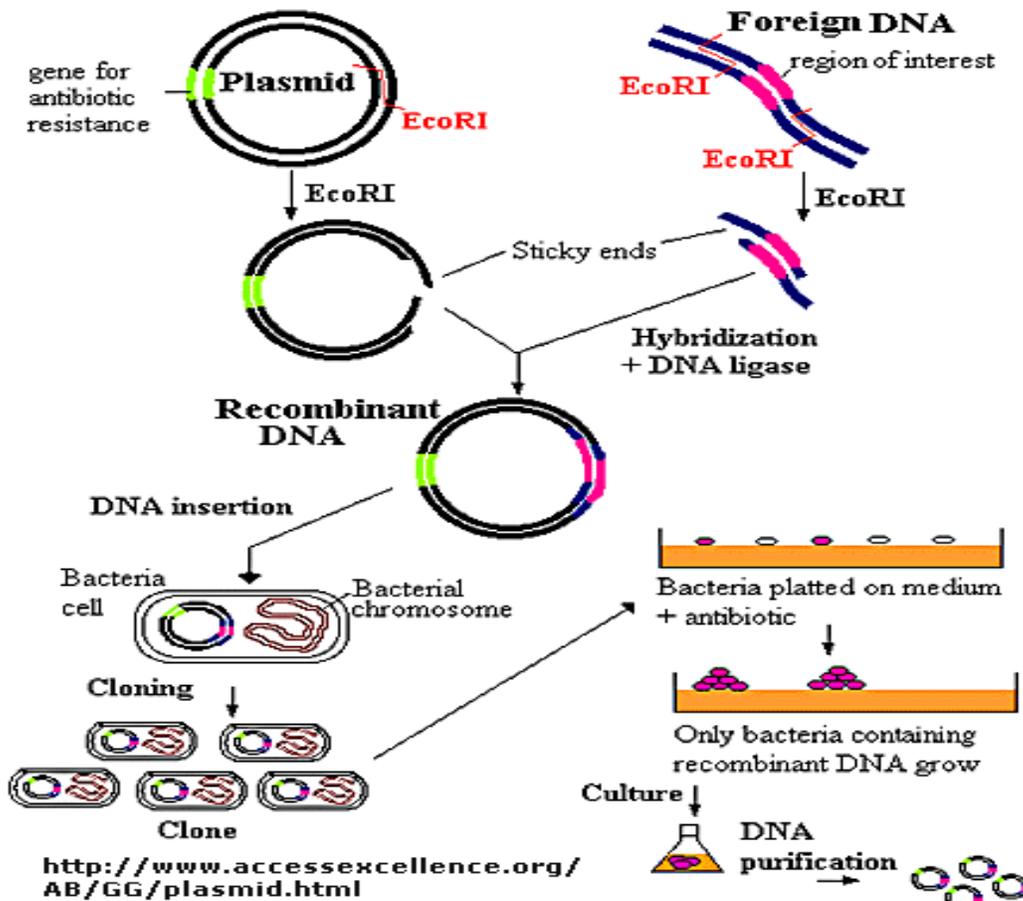
Principe

Le clonage des gènes permet d'obtenir de nombreuses copies du même gène afin de pouvoir travailler dessus : soit en faire le séquençage, soit l'utiliser pour effectuer des transgénèses.

- 1- incorporer le gène intéressant dans un plasmide bactérien en utilisant des enzymes de restriction qui créent des « bouts collants ». Le plasmide doit contenir en plus un gène de résistance à un antibiotique.
- 2- Infecter des bactéries avec ce plasmide
- 3- Les bactéries se multiplient en très grande quantité, toutes identiques, formant des clones.
- 4- Criblage des bactéries ayant intégré le gène intéressant sur un milieu contenant l'antibiotique (cet antibiotique détruit les clones qui ne contiennent pas le gène de résistance et donc le plasmide recombiné)
- 5- Amplification des plasmides dans une culture puis purification de leur ADN et donc du gène intéressant.

Applications

Création de souches de bactéries qui vont contenir un gène d'intérêt, gène qui sera ainsi facilement disponible et amplifiable à volonté.



Cloning into a plasmid

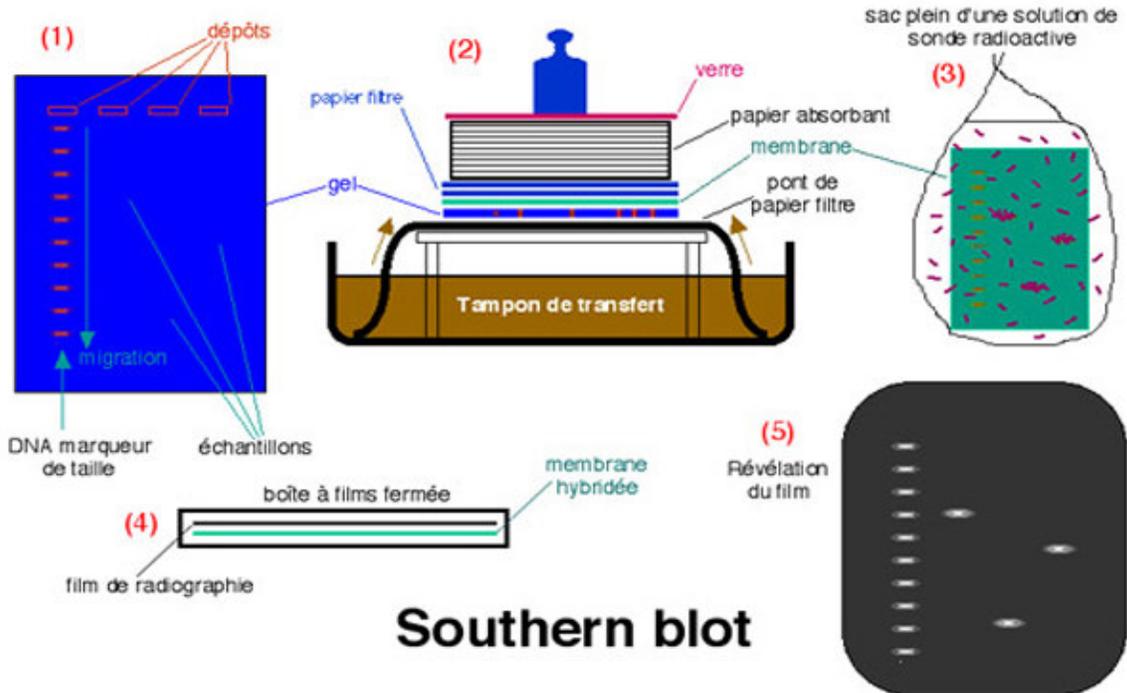
Combinaison électrophorèse + southern blot + autoradiographie

Principe

Séparer des molécules par électrophorèse, par exemple des fragments d'ADN, les transférer sur un support par southern blot puis les hybrider avec une sonde spécifique radioactives pour détecter les fragments recherchés.

applications

-Pour l'ADN, recherche de la présence de tel ou tel gène
-Pour des protéines (alors western blot) mise en évidence d'une protéine spécifique dans un mélange : utilisation pour détecter les anticorps anti VIH dans les dépistage de séropositivité au SIDA par exemple.



Transgénèse et création d'OGM

Principe

Transférer un gène d'une espèce dans un individu d'une autre espèce ou entre individus de la même espèce.

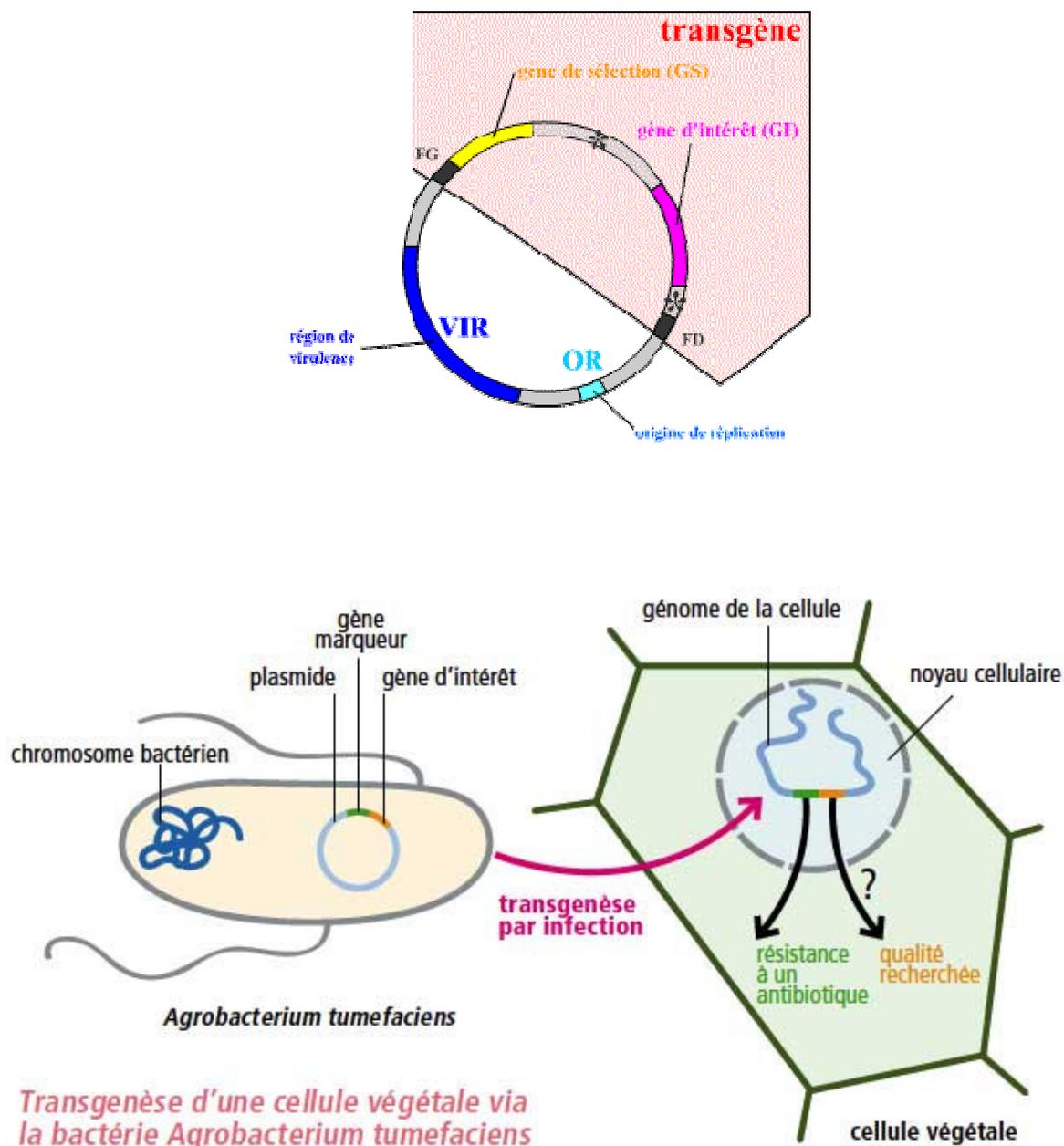
Pour cela il faut utiliser un vecteur qui va pouvoir transporter le gène entre les deux individus : en général, c'est un plasmide.

Pour cela, il faut utiliser des enzymes de restriction qui vont faire apparaître des « bouts collants » complémentaires entre l'ADN du donneur et celui du receveur, ce qui va permettre au transgène de s'insérer dans le génome du receveur.

Le transgène doit contenir, en plus du gène d'intérêt, un gène marqueur qui va permettre de sélectionner les individus qui l'ont réellement intégré.

applications

Fabrication de tous les OGM, essentiellement chez les végétaux (résistance à des herbicides, pesticides...) mais également de plus en plus chez les animaux (insertion du gène de l'insuline humaine chez des chèvres afin de récupérer cette molécule dans leur lait pour traiter les diabétiques...)



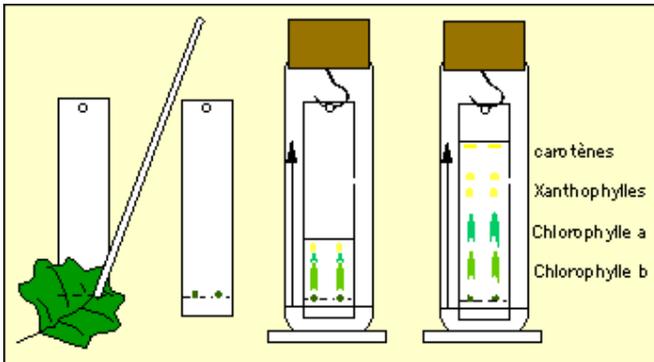
chromatographie

Principe

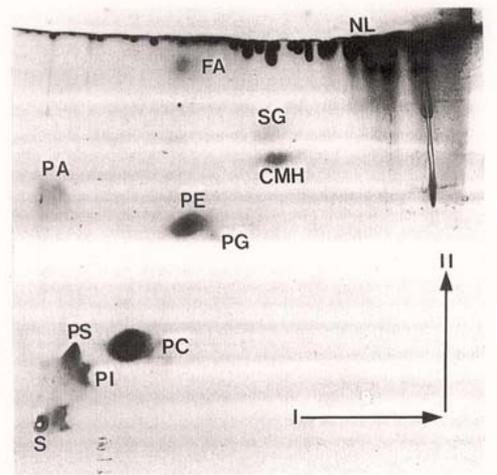
La chromatographie est une technique physique de séparation d'espèces chimiques. L'échantillon contenant une ou plusieurs espèces est entraîné par un courant de phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique) le long d'une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, etc) ; chaque espèce se déplace à une vitesse propre dépendant de ses caractéristiques et de celles des deux phases. Elle peut être unidirectionnelle ou bidirectionnelle(dans deux directions successives, voir document)

applications

Séparation de sucres, protéines, acides aminés, pigments ...



chromatographie de chlorophylle brute
(pigments observables directement)



chromatographie bidirectionnelle + autoradiographie



chromatographie d'acides aminés + coloration spécifique

Principe	
application	

