

Voir en annexe, un tableau résumant toutes les techniques de la génétique moléculaire.

1. Découverte des enzymes de restriction.(Pages 126/127)

A l'aube des années 1970, bien que les bases de l'expression des gènes soit de mieux en mieux comprises, on ne sait pas les isoler pour en faire une étude approfondie. Un pas décisif sur le plan technique va permettre de mettre au point les "outils du génie génétique".

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BGbioch/POLY.Chp.5.3.html>

http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/genes_et_genomes/fragmentation.html

T4 BACTERIOPHAGE

DNA
protein coat
sheath
baseplate
tail fiber

90 nm

a) Des outils pour étudier les gènes.

Des travaux furent menés à bien en 1965 par Werner ARBER, Daniel NATHANS et Hamilton SMITH qui obtiendront le prix Nobel en 1978: ils découvrent **les enzymes de restriction** (endonucléases) **permettant de découper l'ADN en petits segments à des endroits déterminés.**

Les enzymes de restriction sont produites par les bactéries lorsqu'elles sont infectées par un bactériophage :

<http://membres.lycos.fr/carcinus/GENETIQUE/GENBACT/Bacteriophage.html>

Une animation : <http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/tpgenetmic/Animation%20flash/propagation.swf>

- **Arber** découvre en 1962 que des bactéries sont capables de se protéger de l'infection par un virus, en découpant l'ADN viral : phénomène de restriction.

L'expérience. Des bactériophages qui se développent normalement dans certaines souches bactériennes se développent mal lorsqu'on les transfère dans d'autres souches de la même espèce qui sont ainsi protégées de l'infection. On parle de restriction du développement du phage. On montre que ce phénomène est dû à une dégradation de l'ADN du phage par des enzymes bactériennes appelées alors enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont donc des enzymes qui permettent aux bactéries de se défendre contre les bactériophages en coupant leur ADN. Chaque souche bactérienne fabrique généralement une ou plusieurs enzymes de restriction.

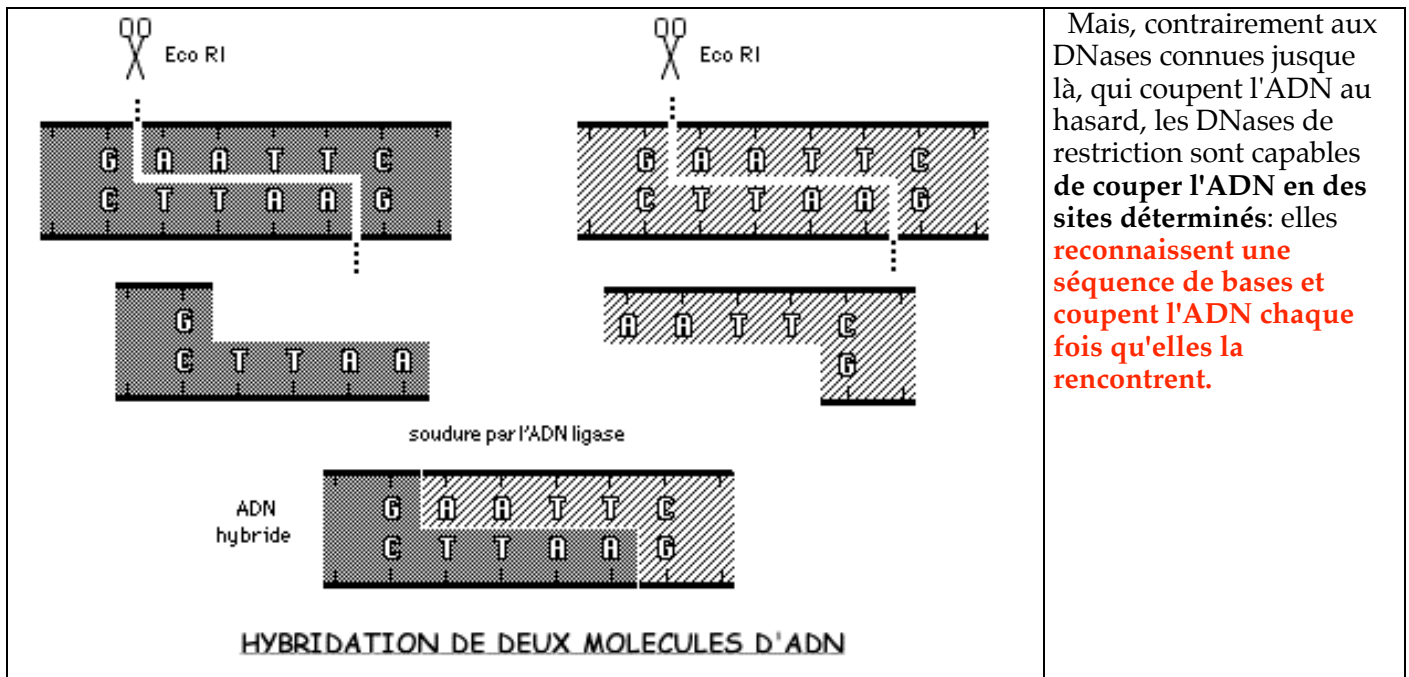
Souche 1 → Multiplication des phages

Souche 2 → Les phages se développent mal → ADN du phage → ADN du phage dégradé par des enzymes bactériennes

Souche bactérienne infectée	Provenance du phage λ	
	Phages λ cultivés sur souche B	Phages λ cultivés sur souche K12
Souche B	Infection efficace	Infection médiocre
Souche K12	Infection 10 000 fois moins efficace	Infection efficace
Autre souche	Infection efficace	Infection efficace

- **Smith** isole les enzymes responsables : enzymes de restriction.

- **Nathans** transforme les enzymes de restriction en outils.

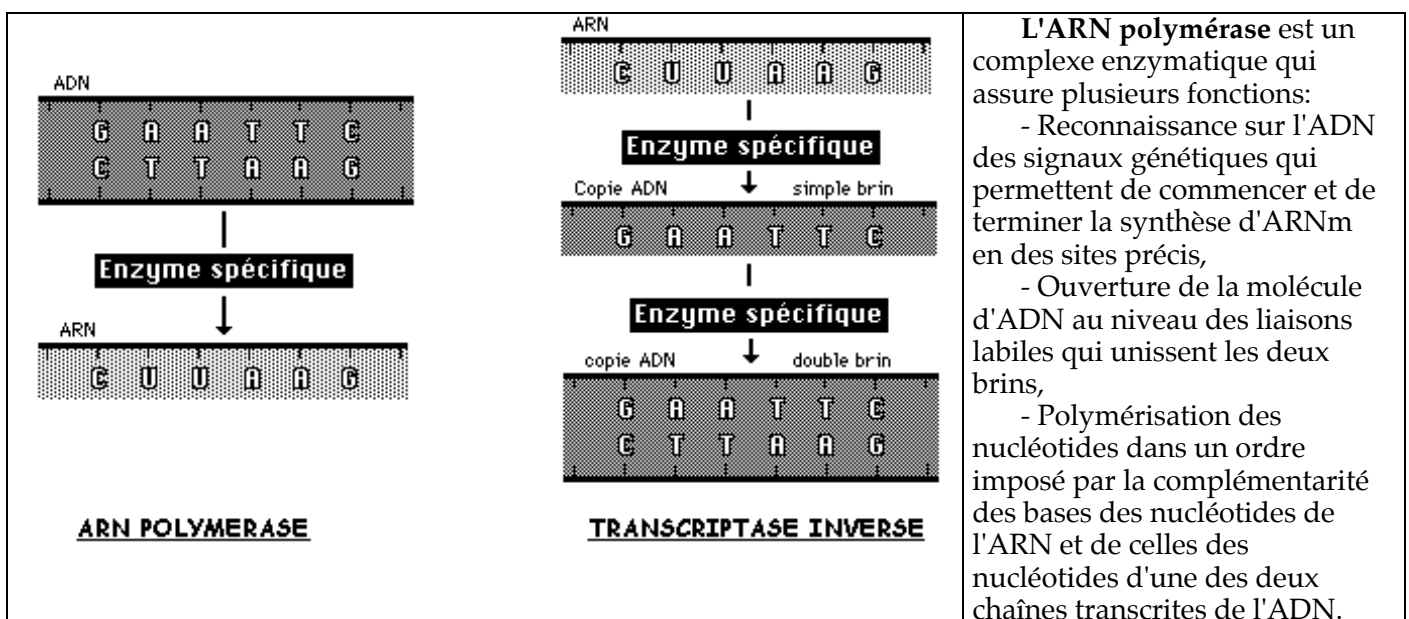


Mais, contrairement aux DNases connues jusque là, qui coupent l'ADN au hasard, les DNases de restriction sont capables de couper l'ADN en des sites déterminés: elles reconnaissent une séquence de bases et coupent l'ADN chaque fois qu'elles la rencontrent.

Les chercheurs disposent à l'heure actuelle de plusieurs centaines de telles enzymes, véritables "ciseaux moléculaires" (Eco Ri, Hind III, Taq I...) reconnaissant des séquences de bases spécifiques et engendrant des fragments d'ADN dont les extrémités forment de véritables "bouts collants".

Cette propriété en fait des outils de choix permettant de découper l'ADN pratiquement où l'on veut non seulement pour isoler des gènes, mais aussi pour les insérer dans des phages ou des plasmides qui se révèlent d'excellents vecteurs pour multiplier des gènes étrangers.

L'hybridation de deux molécules d'ADN provenant de deux espèces différentes nécessite la soudure des fragments obtenus après action des enzymes de restriction. Une enzyme, l'ADN ligase, facilite la réassociation des "bouts collants" par le biais de la complémentarité de leurs bases.



L'ARN polymérase est un complexe enzymatique qui assure plusieurs fonctions:

- Reconnaissance sur l'ADN des signaux génétiques qui permettent de commencer et de terminer la synthèse d'ARNm en des sites précis,
- Ouverture de la molécule d'ADN au niveau des liaisons labiles qui unissent les deux brins,
- Polymérisation des nucléotides dans un ordre imposé par la complémentarité des bases des nucléotides de l'ARN et de celles des nucléotides d'une des deux chaînes transcrites de l'ADN.

En 1970, Howard Martin TEMIN et David BALTIMORE isolent, à partir de virus, la transcriptase inverse, une enzyme capable de réaliser l'opération inverse de celle de l'ARN polymérase, qui permet d'obtenir de l'ADN à partir de l'ARN. Ils seront récompensés par le Nobel en 1975 avec Renato DULBECCO.

Son utilisation rend possible la synthèse d'un gène à partir de l'ARNm gouvernant l'assemblage d'une protéine. On obtient d'abord une copie d'ADN simple brin, puis à l'aide d'autres enzymes spécifiques, une copie double brin d'ADN complémentaire (ADNc).

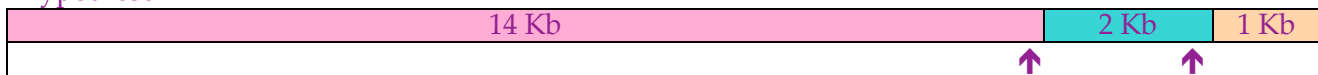
L'hybridation ultérieure de ce gène avec un autre ADN exige la formation de nouveaux "bouts collants" à chacune de ses extrémités.

b) Principe d'établissement d'une carte de restriction : étudier les fragments de restriction :

Exercice 2 page 145.

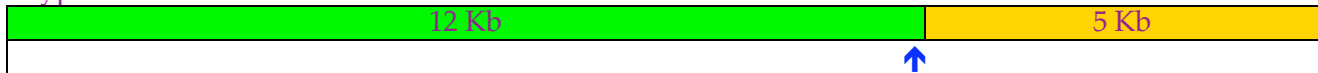
- Action de ER1 : l'électrophorèse montre que l'on obtient 3 fragments, il y a donc eut 2 site de coupure spécifique reconnus.

Hypothèse :

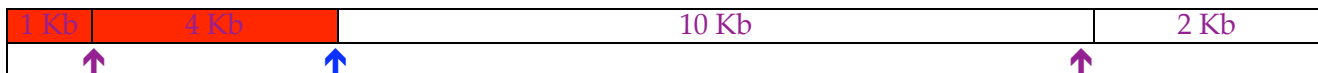


- Action de ER2 : L'électrophorèse montre que l'on obtient 2 fragments, il y a donc eut 1 site de coupure spécifique (≠ de ER1) reconnu.

Hypothèse :



- Action de ER1 + ER2 : L'électrophorèse montre que l'on obtient 4 fragments, il y a donc bien 3 sites de coupure et la seule possibilité est :



La séquence recherchée est située dans le segment rouge, les 2 fragments le composant apparaissant après marquage radioactif à l'autoradiographie.

TP ANAGENE : Utilisation des enzymes de restriction dans l'établissement du polymorphisme d'un gène : Les allèles du gène de la rhodopsine

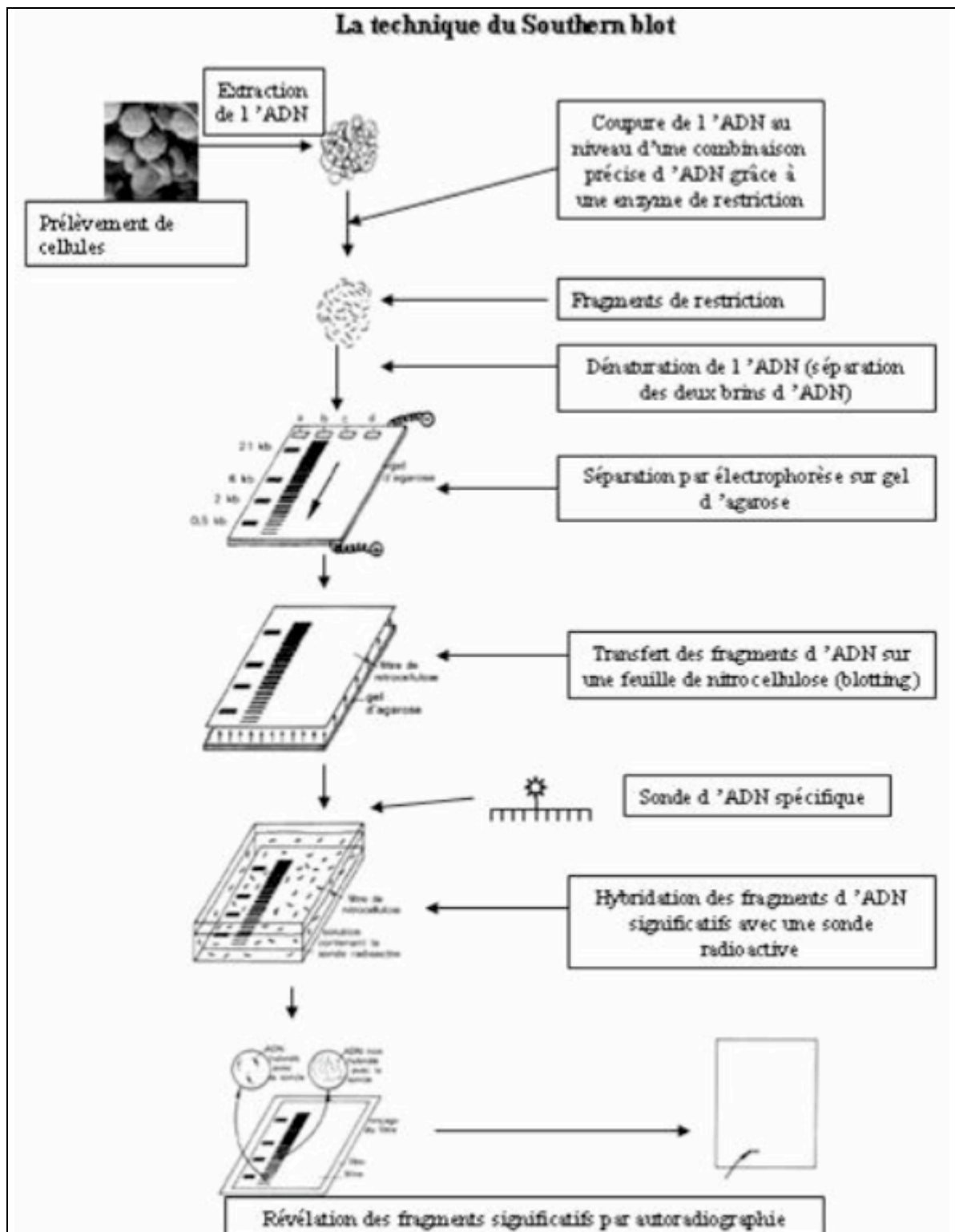
Voir la correction <http://beaussier.mayans.free.fr/spip.php?article257>

2. Le clonage et le séquençage des gènes.

a) La technique du southern blot. (Page 127)

- L'ADN est traité par une enzyme de restriction: plusieurs milliers de fragments de tailles différentes sont ainsi produits.
- Le mélange est disposé dans un puits d'une plaque de gel d'agarose et soumis à une électrophorèse qui provoque la migration des fragments, d'autant plus vite qu'ils sont petits.
- Après dénaturation de l'ADN (séparation des brins complémentaires), la plaque est mise au contact d'un filtre de nitrocellulose qui recueille une empreinte ("blot") du gel.
- Le filtre est immergé dans une solution contenant une sonde moléculaire radioactive (fragment d'ADN reconnaissant une séquence du génome) pendant quelques heures à 65°C: celle-ci se fixe sur les fragments complémentaires. Le filtre est ensuite rincé pour éliminer les sondes non fixées.
- On procède à la révélation de l'emplacement de la sonde et donc des fragments complémentaires par une technique appropriée : autoradiographie pour les sondes radioactives, photographie pour les sondes fluorescentes, réactions enzymatiques pour les ligands reconnus par des protéines spécifiques.

Exemple : partie 2 exercice 2 page 145



Cette technique est très sensible et permet de reconnaître un fragment sur les milliers au départ. Elle permet ainsi de faire la recherche simultanée chez plusieurs individus et de procurer une carte génétique d'une grande spécificité et fiabilité, par construction d'une carte de restriction. L'analyse est appelée polymorphisme de longueurs de fragments de restriction (RFLP: « restriction fragment length polymorphisme »).

La découverte des enzymes de restriction ont permis la mise au point d'une nouvelle technologie moléculaire.