

Module « Génie génétique »

Q1

Les vecteurs sont de petits ADN dans lesquels on insère le fragment de l'ADN (exogène ou insert) à étudier dans le but de l'isoler et de l'amplifier. Ils possèdent dans leurs génomes les signaux nécessaires pour leur répllication. Cette répllication se fait uniquement lorsqu'ils sont introduits dans des cellules hôtes. Il s'agit donc d'une amplification in vivo, par opposition à la méthode d'amplification in vitro (PCR), on distingue :

- Vecteur natif lorsqu'il ne contient que son ADN propre.
- Vecteur recombiné lorsqu'il a intégré un fragment d'ADN étranger, quel qu'il soit. **(1,5)**

2.

1. Les plasmides (pBR322, pUC18, pUC19).

2. Les bactériophages (vecteurs viraux) (Phage λ Lambda, Le phage M13).

3. Systèmes hybrides

- Phagemide (plasmide + M13)
- Cosmide (plasmide + phage λ)
- λ Zap (plasmide + phage λ + phage M13)

4. Chromosomes

- Les YAC (Yeast Artificial Chromosome)
- Les BAC (Bacterial artificial chromosome)
- Les PAC (P1 Artificial Chromosome) sont des dérivés du phage P1. **(4)**

3. Taille du vecteur / Cellule réceptrice. **(1,5)**

Q2

2- La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend :

- L'extrait d'ADN (ADN matriciel).
- Quelques microlitres de la Taq polymérase (ADN polymérase), au sein d'un tampon adéquat.
- Les amorces (simple brin de 15 à 30 bases), qui sont des oligonucléotides de synthèse, les séquences terminales 5' des deux brins du fragment d'ADN à amplifier doivent être connues.
- Les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. **(2)**

Cette technique est utilisée pour la mise en évidence et la caractérisation d'ARN en très faible quantité, ou bien lorsque la source d'ARN est très limitée. La RT-PCR est une technique qui permet d'amplifier de manière élective (et sous forme d'un fragment ADNc double brin) une séquence d'ARN spécifique présente dans un mélange d'ARN-polyA, ou d'ARN totaux, issus d'un tissu supposé exprimer le gène d'intérêt. Cette réaction est catalysée par la transcriptase inverse des rétrovirus (reverse transcriptase) qui synthétise une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ARN.

- Après extraction des ARN totaux, les ARNm sont isolés par chromatographie d'affinité grâce à des oligodT (oligonucléotide polyT), ils se caractérisent par une séquence polyA en 3'.
- Les ARNm sont soumis ensuite à la transcriptase inverse qui va générer une copie d'ADN (ADNc) de chaque ARNm.
- À l'issue de la transcription inverse, les ARNm sont hydrolysés (traitement alcalin, RNase ou température).
- Les étapes suivantes sont réalisées dans l'enceinte du thermocycleur. Les ADNc monocaténaire sont alors répliqués par l'ADN polymérase. **(3)**

Q3

Les séquences répétées en tandem

- Les minisatellites : (ou VNTR pour Variable Number Tandem Repeat) sont des séquences répétées en tandem dont la taille du motif unitaire est comprise entre 10 à 60 nucléotides.
- Microsatellites : c'est une séquence d'ADN formée de 2 à 10 nucléotides (répétée de 10 à 100 fois) qui varie selon l'espèce, mais aussi d'un individu à l'autre et d'un allèle à l'autre chez un même individu, voire d'une cellule à l'autre du fait d'erreurs au cours de la réplication de l'ADN.
- Macrosatellites sont des séquences répétées en tandem dont la taille du motif unitaire est comprise entre 5 à 300 nucléotides. (3)

Le nombre « N » est différent entre espèces différentes. (2)

Q4

- Détermination de la séquence d'ADN de ce gène en utilisant la technique de séquençage et également introduire une mutation au gène cloné (mutagénèse) et le réintroduire dans son hôte d'origine afin d'étudier les propriétés fonctionnelles de ce gène, aussi utilisation et fabrication des sondes pour la cartographie ou le diagnostic génétique.
- Introduction du gène cloné dans un nouvel hôte afin de créer un organisme transgénique (ou génétiquement modifié) que l'on n'aurait pas pu obtenir facilement par les méthodes de croisements naturels et également la possibilité de modifier le métabolisme par génie génétique.
- Les séquences d'acides nucléiques peuvent être utilisées comme un outil de diagnostic et également pour la recherche de nouvelles thérapies pour les maladies génétiques. (3)