

Chapitre 7 : biologie moléculaire
Méthodes d'étude des gènes

Pr. Julien Fauré

Plan et objectifs du cours

Comment étudier la fonction ou l'expression d'un gène ?

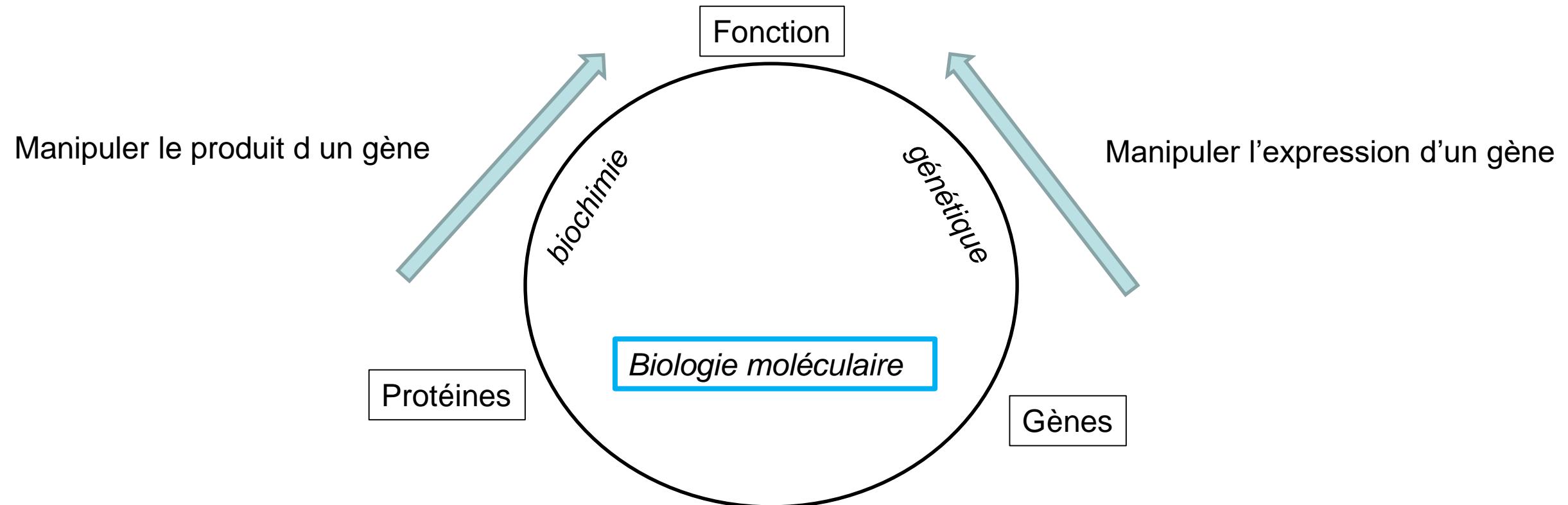
Introduction

Le clonage moléculaire

Analyse des éléments régulant la transcription

Modulation expérimentale de l'expression d'un gène

Introduction



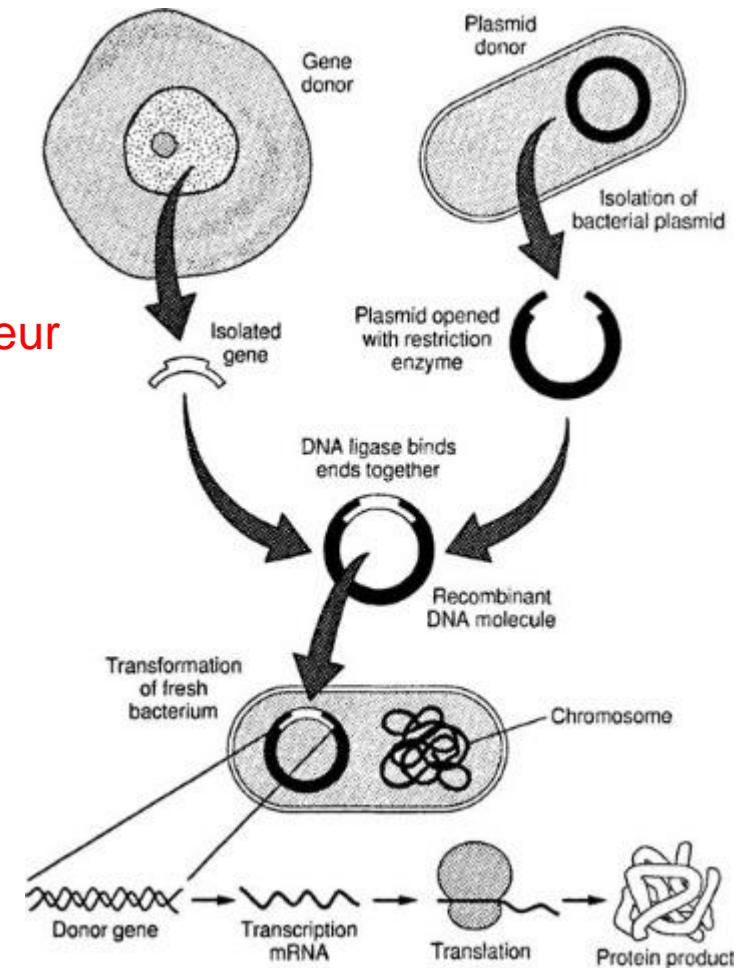
Le clonage moléculaire

- obtenir une population de bactéries, de cellules ou d'organismes qui contiennent le même matériel génétique
 - population homogène de cellules identiques (population clonale)
 - organisme vivant identique à un organisme d'origine
- clonage - pour amplifier et conserver une séquence d'ADN
 - pour exprimer une séquence d'intérêt
 - pour introduire un gène dans des cellules ou des organismes
 - pour produire une protéine d'intérêt
 - ...

Le clonage moléculaire

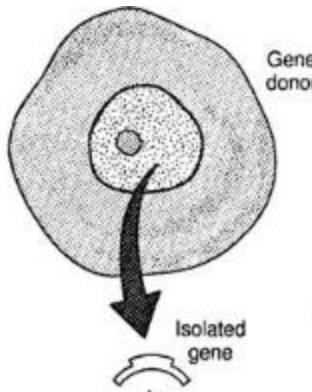
principales étapes du clonage

1. préparation de l'**insert** à cloner (fragment d'ADN d'intérêt) et du **vecteur**
2. intégration-ligation de l'insert dans le vecteur
3. transformation de l'hôte par le vecteur recombiné
4. sélection des hôtes recombinants



Le clonage moléculaire

L'insert



Tout fragment d'ADN d'intérêt manipulable :

ADN génomique fragmenté par des enzymes de restriction

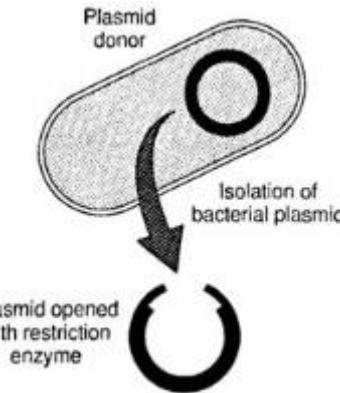
produit de PCR

ADNc

...

Le clonage moléculaire

Vecteurs

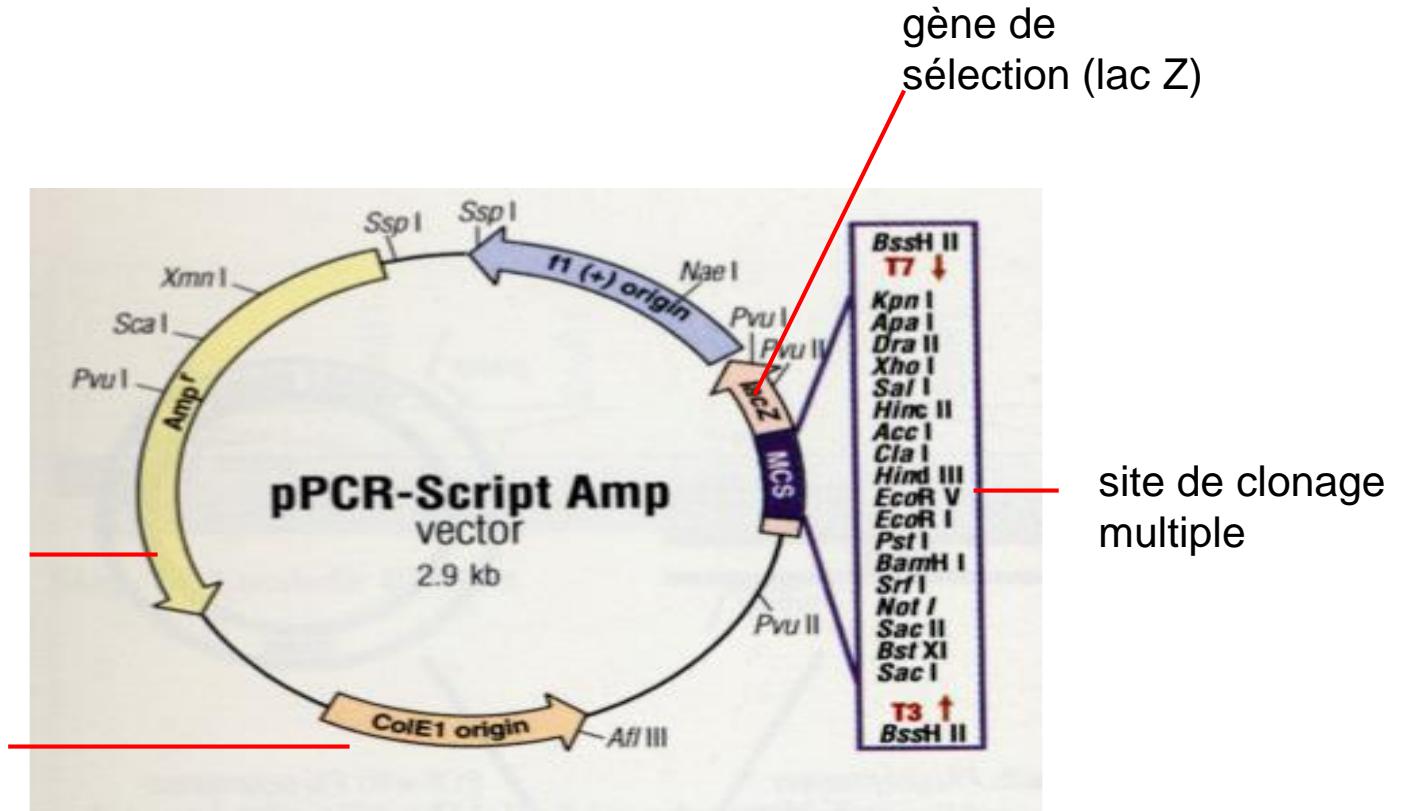


➤ propriétés générales

➤ les plasmides

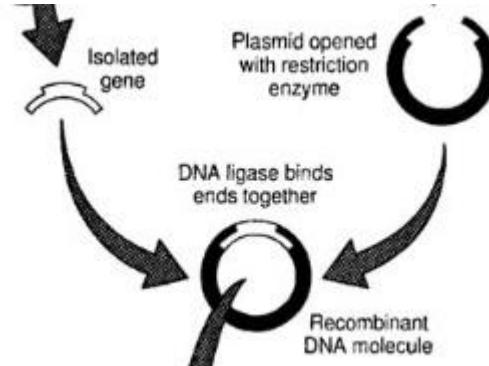
gène de résistance
à un antibiotique

origine de réPLICATION



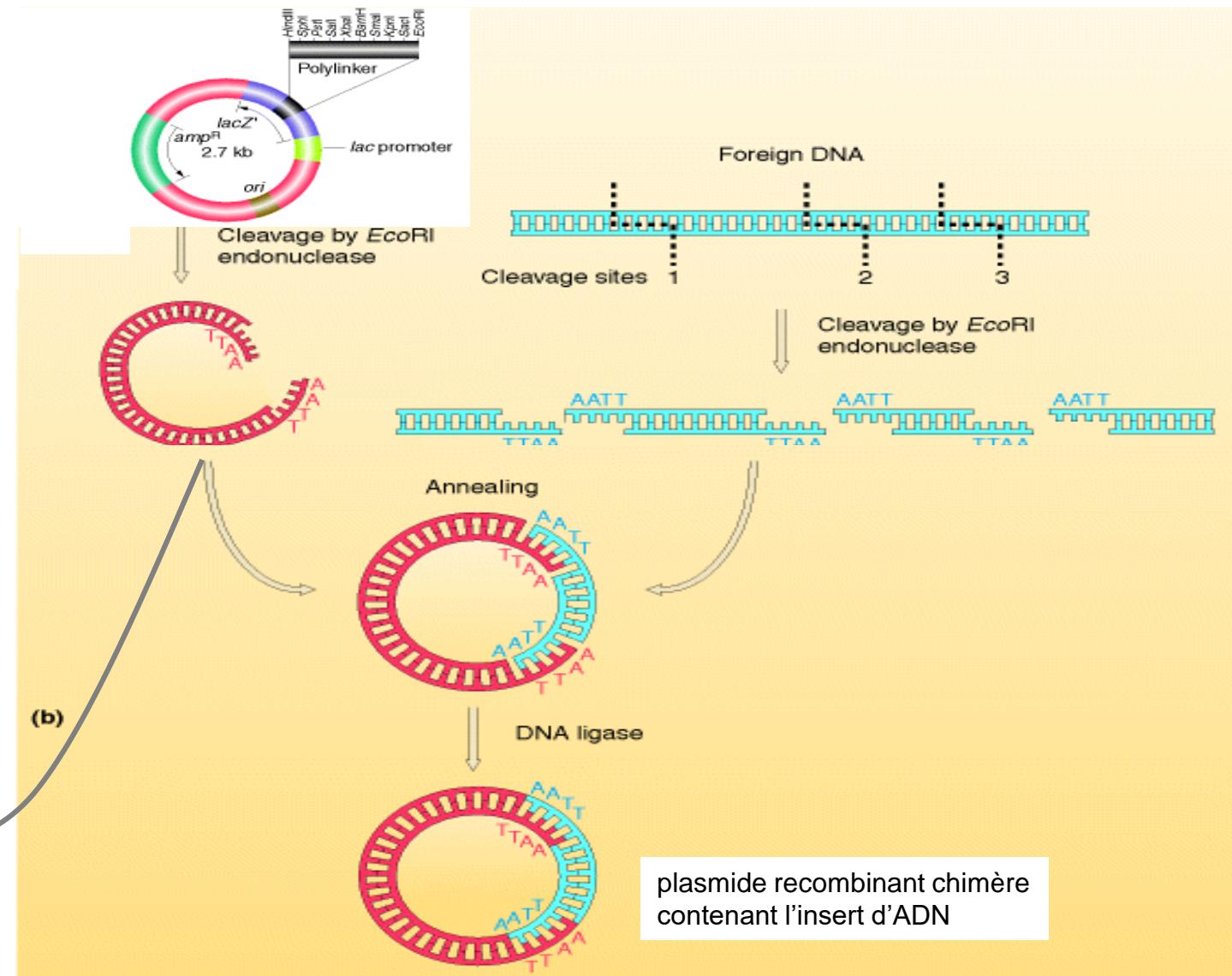
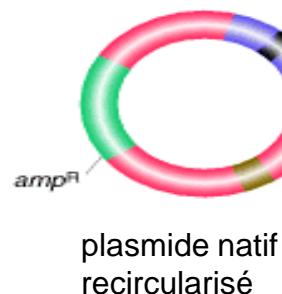
Le clonage moléculaire

Intégration



coupe du vecteur et de l'ADN à intégrer avec le même enzyme de restriction

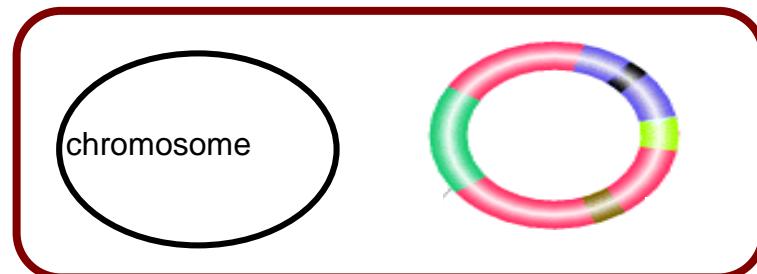
ligation des extrémités libres du vecteur et de l'insert



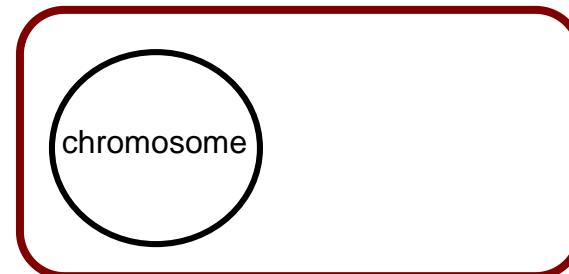
Le clonage moléculaire

Transformation et sélection des bactéries hôtes

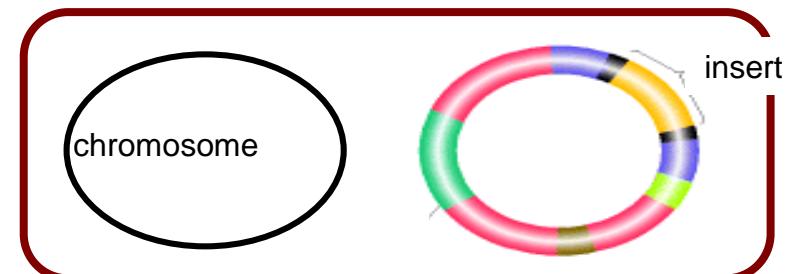
- les plasmides sont introduits dans les bactéries : la transformation



bactérie avec plasmide natif recircularisé



bactérie sans plasmide



bactérie avec plasmide recombinant

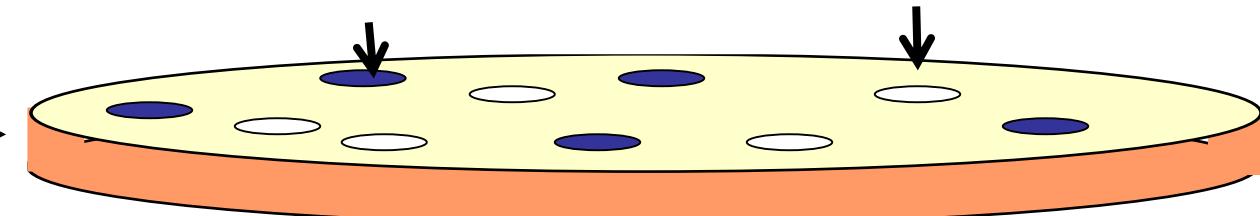
- les bactéries ayant intégré un plasmide sont sélectionnées grâce aux 2 gènes de sélection présents dans le vecteur (ex choisi : gène de résistance à l'ampicilline et gène permettant l'expression de la β -galactosidase)

colonie bleue: vecteur seul

milieu nutritif
+ ampicilline
+ Xgal

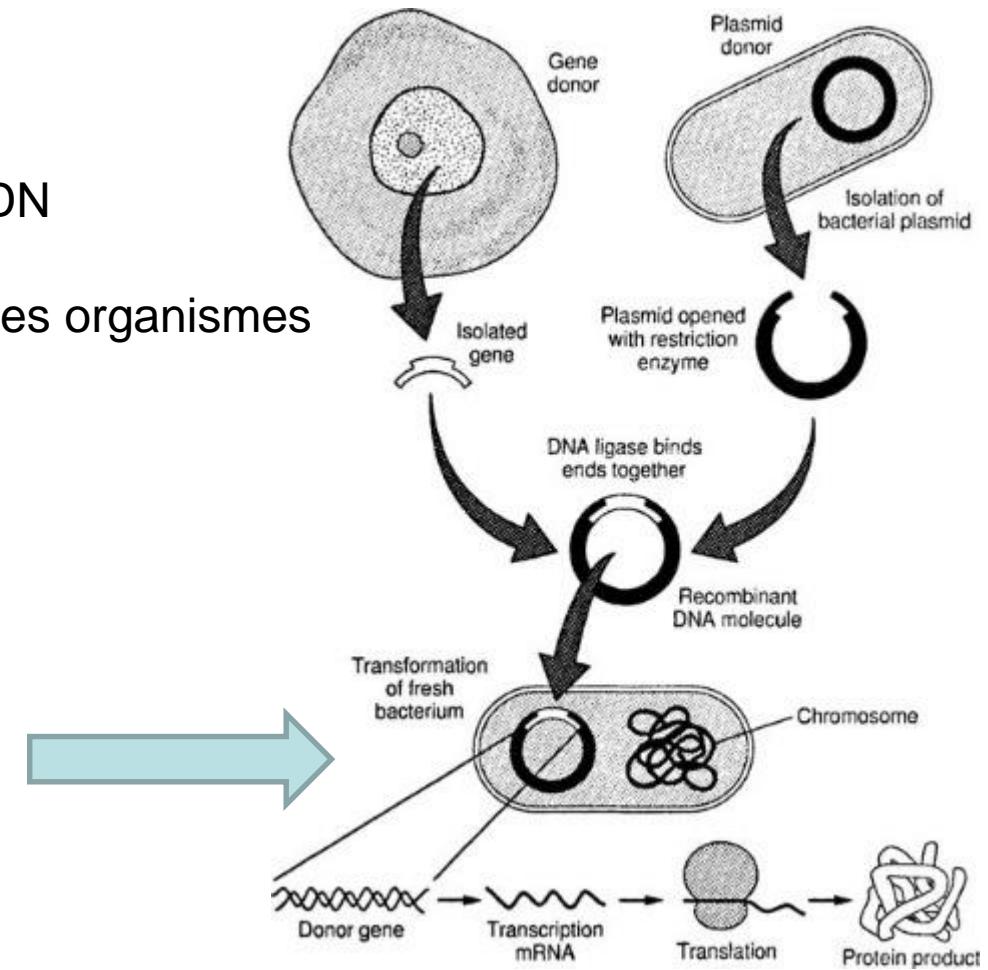


colonie blanche: vecteur recombiné



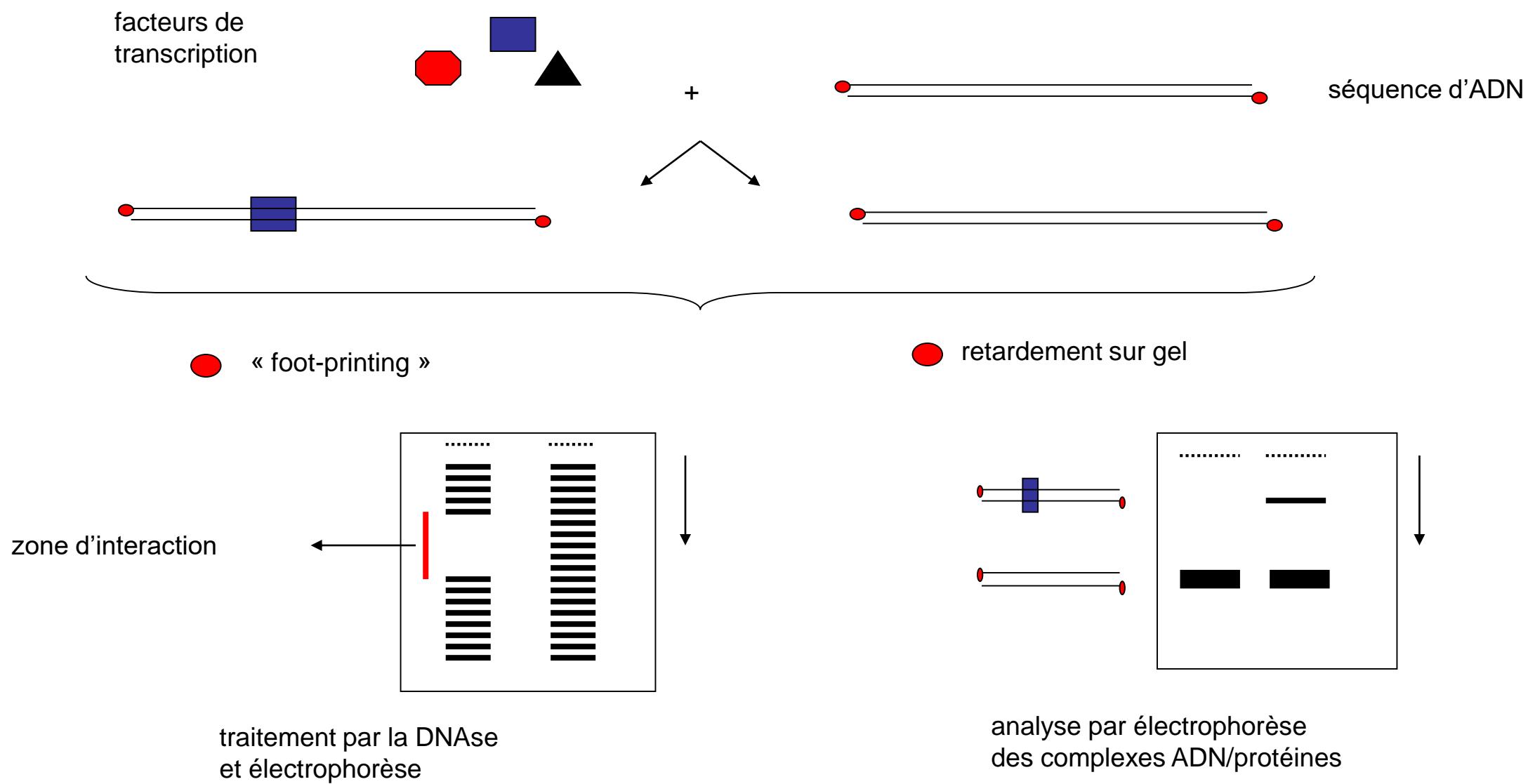
Le clonage moléculaire

- pour amplifier et conserver une séquence d'ADN
- pour exprimer une séquence d'intérêt
- pour introduire un gène dans des cellules ou des organismes
- pour produire une protéine d'intérêt
- ...



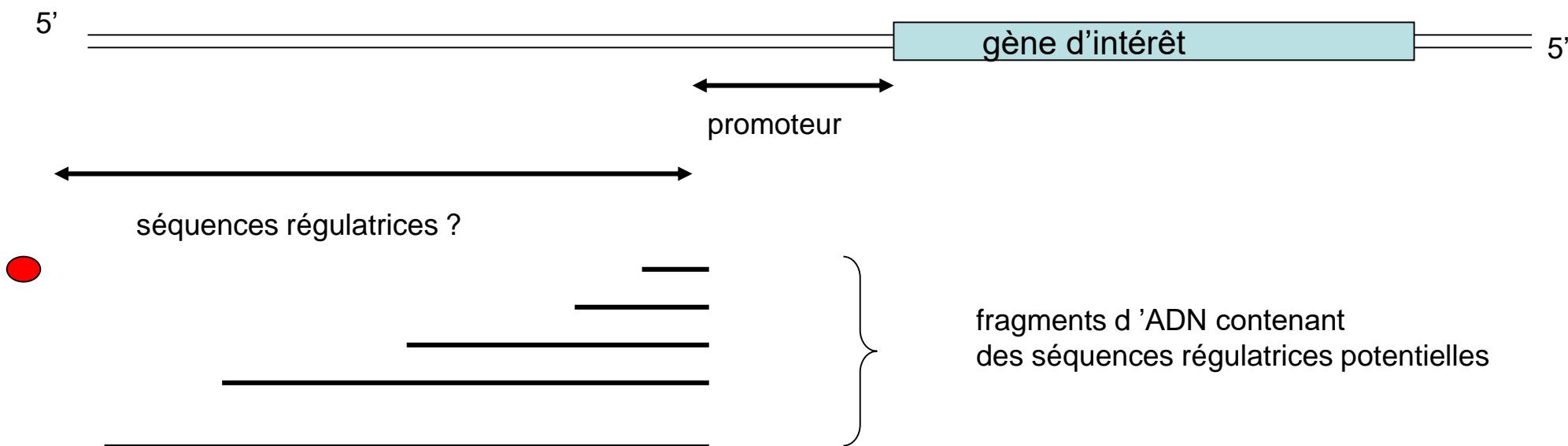
Analyse des éléments de régulation de la transcription

Analyse de l'interaction entre facteurs protéiques trans et séquences ADN cis

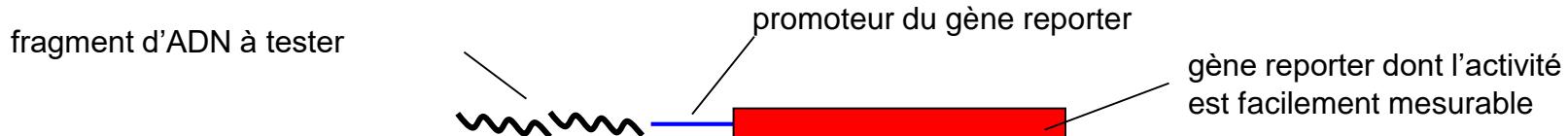


Analyse des éléments de régulation de la transcription

Caractérisation de séquences régulatrices



- insertion de ces séquences devant le promoteur d'un gène « reporter »

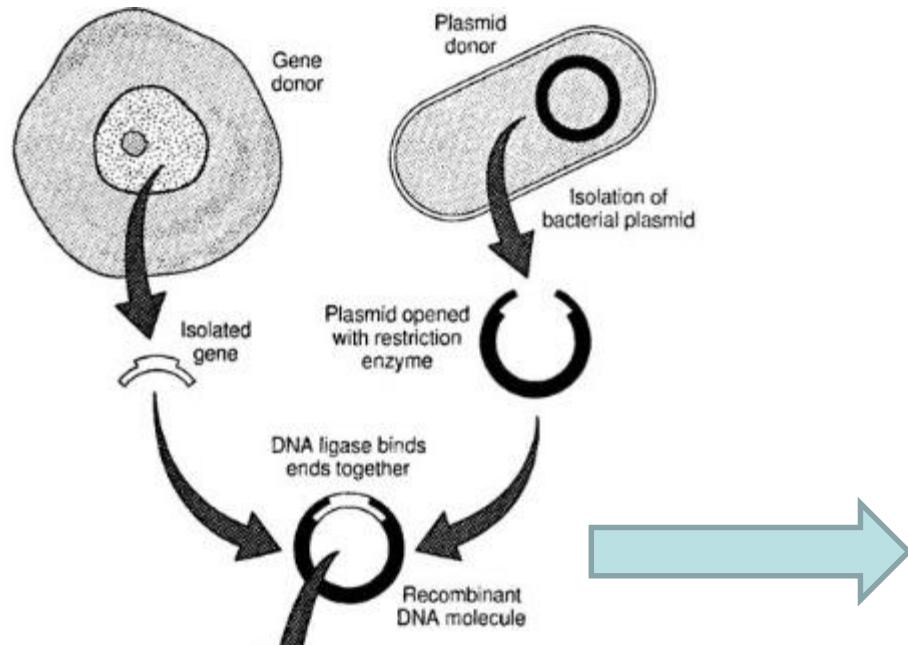


- intégration de la construction dans un vecteur, transfection cellulaire et mesure de l'expression du gène « reporter » dans la cellule modifiée

expression du gène = (f) protéine = (f) ARNm) = (f) rôle de la séquence testée

Modulation de l'expression d'un gène

Expression



Cellules en culture

Organe, dans un organisme modèle

Modulation de l'expression d'un gène

Expression

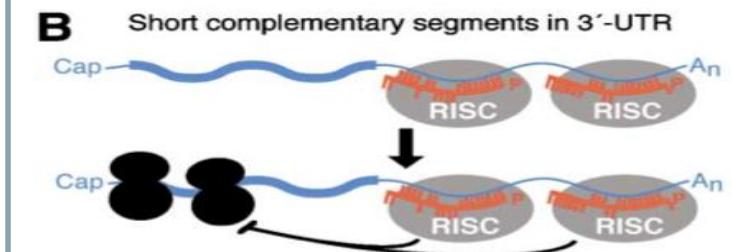
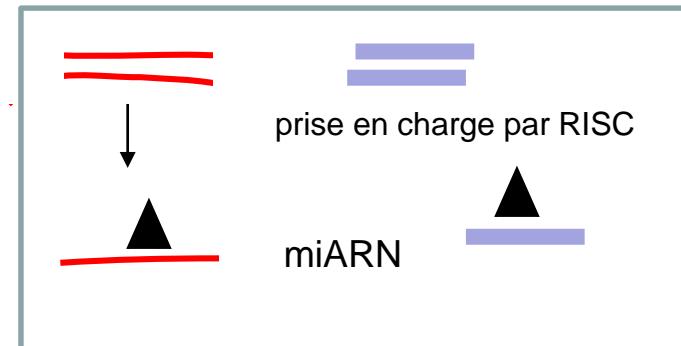
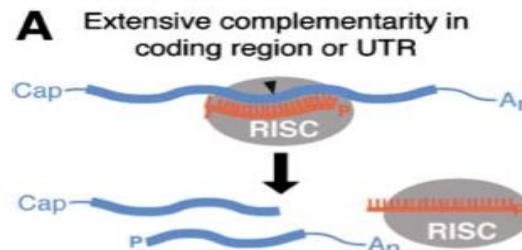
Extinction

- utilisation d'ARN anti-sens et d'ARN interférents

- hybride ARNm normal / ARN anti-sens : bloquer l'épissage=> expression ↘ ↘ ↘



- hybride ARNm normal / ARNsi : dégradation des ARNm => expression ↘ ↘



Modulation de l'expression d'un gène

Expression

Extinction

- utilisation de anti-sens et d'ARN interférents

- hybride ARNm normal / ARN anti-sens : expression ↘↘

- hybride ARNm normal / ARNsi : dégradation des ARNm = expression ↘↘

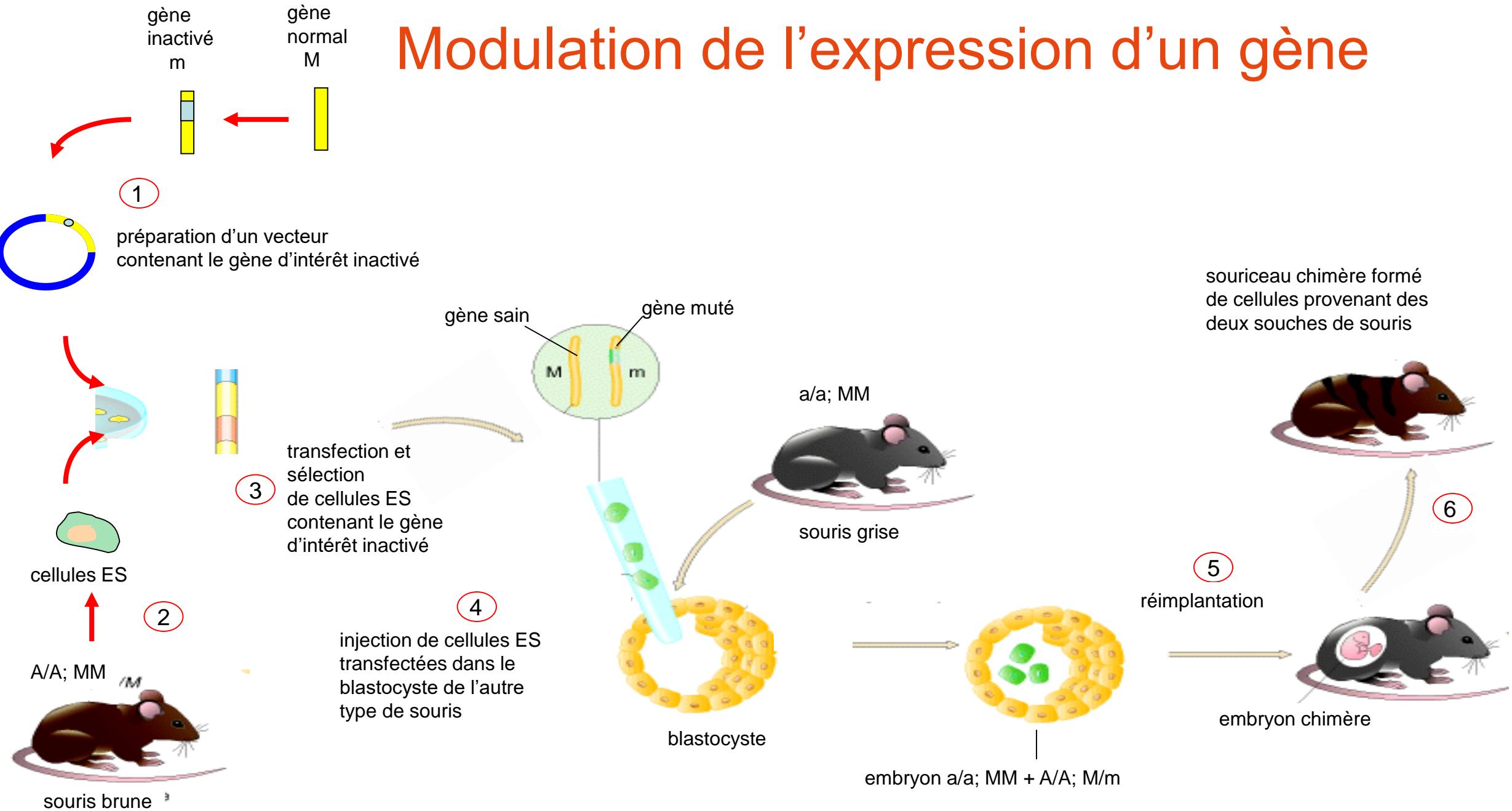
- invalidation génique

- remplacement du gène ciblé par recombinaison homologue dans une cellule souche embryonnaire par :

- un gène inactivé (KO constitutif, KO conditionnel)
- un gène modifié (K-In)

- animaux chimériques et sélection des homozygotes par croisement

Modulation de l'expression d'un gène



Messages essentiels du cours

- Le clonage permet de manipuler un gène
- On peut étudier les facteurs régulant la transcription
- On peut manipuler l'expression d'un gène
- Il existe des méthodes d'analyse globales de l'expression des génomes

➤ analyse du transcriptome

➤ analyse du protéome

➤ analyse du métabolome



analyses simultanées du produit (ARN, protéine, activité) de l'expression d'une grande population de gènes

Mentions légales

L'ensemble de ce document relève des législations française et internationale sur le droit d'auteur et la propriété intellectuelle. Tous les droits de reproduction de tout ou partie sont réservés pour les textes ainsi que pour l'ensemble des documents iconographiques, photographiques, vidéos et sonores.

Ce document est interdit à la vente ou à la location. Sa diffusion, duplication, mise à disposition du public (sous quelque forme ou support que ce soit), mise en réseau, partielles ou totales, sont strictement réservées à l'Université Grenoble Alpes (UGA).

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits à l'Université Grenoble Alpes (UGA), et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.