



Cours de Génie Génétique

Licence biologie moléculaire

Chapitre II

Mutagenèse et mutation

Dr. Fathi Berrabah

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de biologie

Université Ziane Achour Djelfa

2016/2017

Evolution des génomes

Complexité évolutive

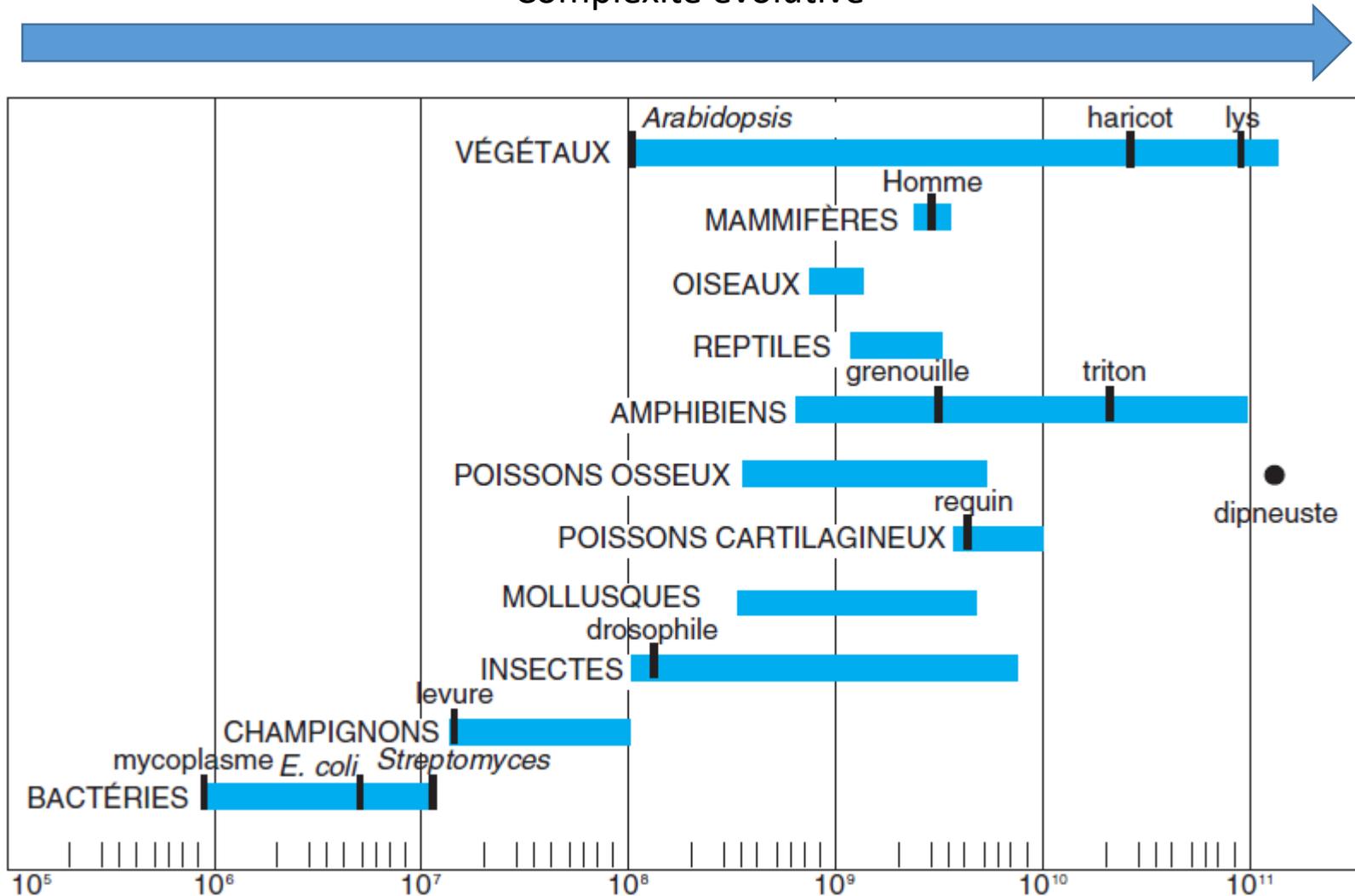
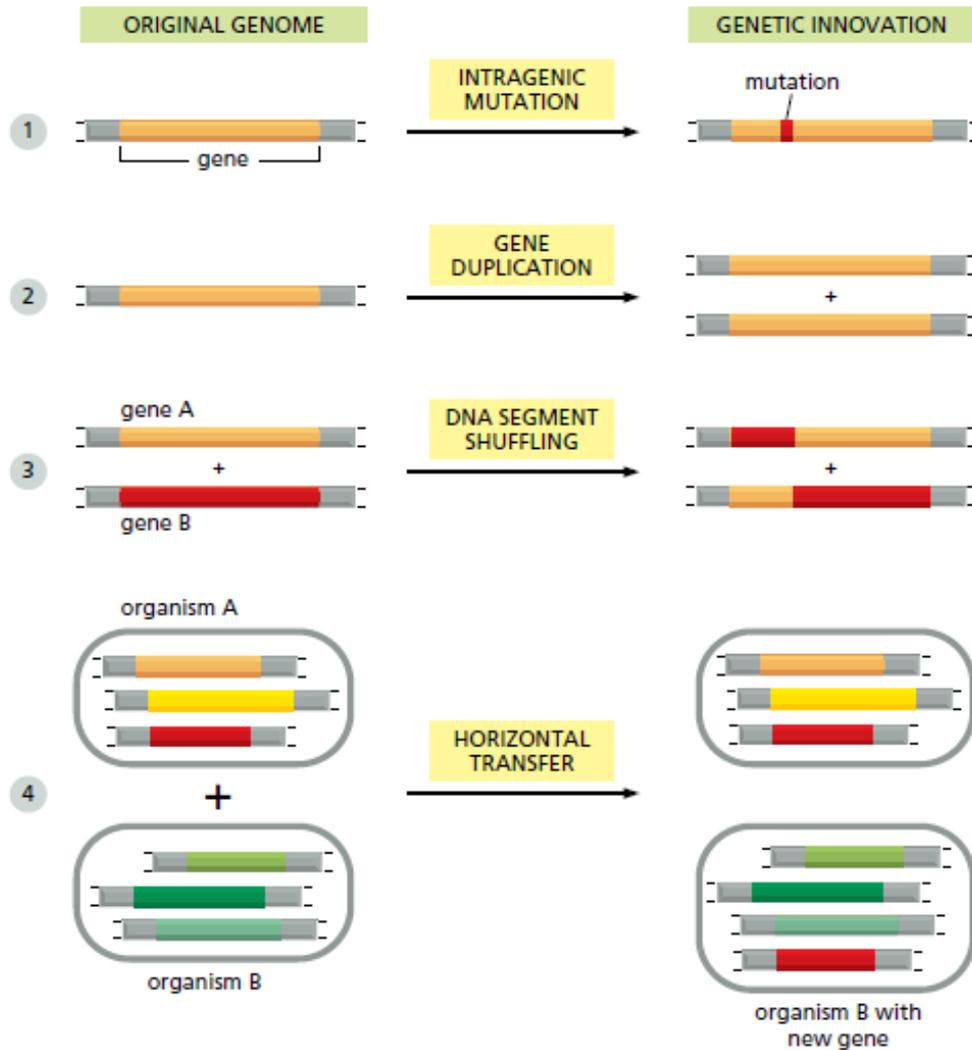


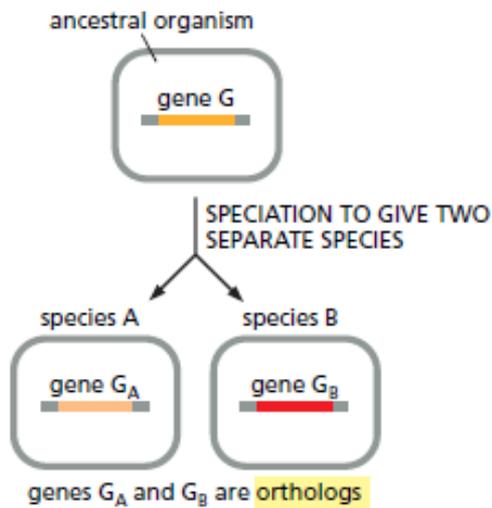
Diagramme représentant la variation des tailles des génomes des êtres vivants

Les mutations à la base de la diversité génétique

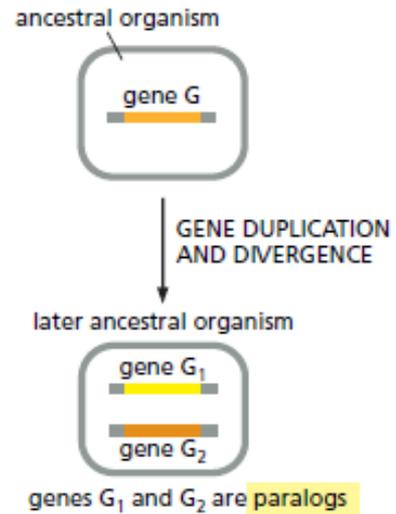


Les modes d'innovation pour la diversification des gènes

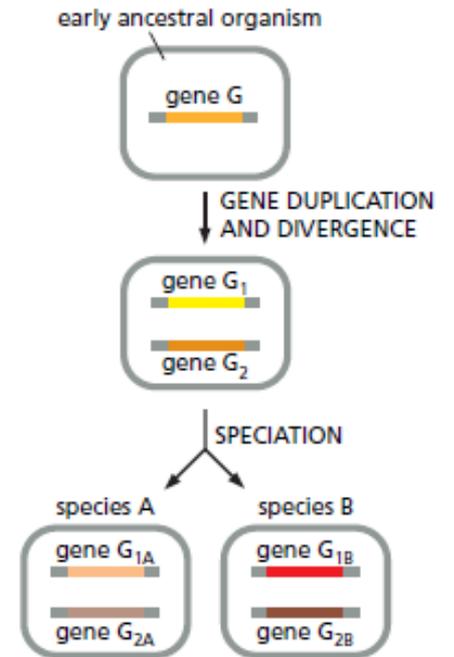
Les mutations à la base de la diversité génétique



(A)



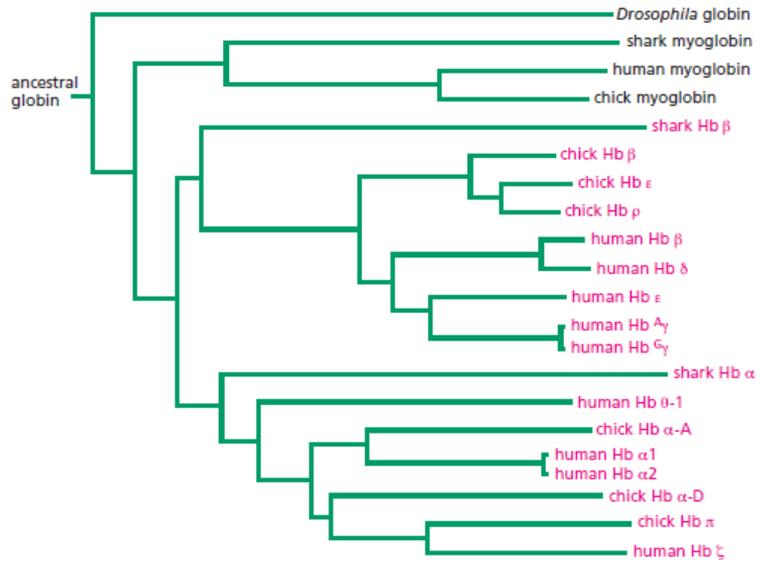
(B)



all G genes are **homologs**

G_{1A} is a **paralog** of G_{2A} and G_{2B}

but an **ortholog** of G_{1B}



Les mutations à la base de la diversité génétique

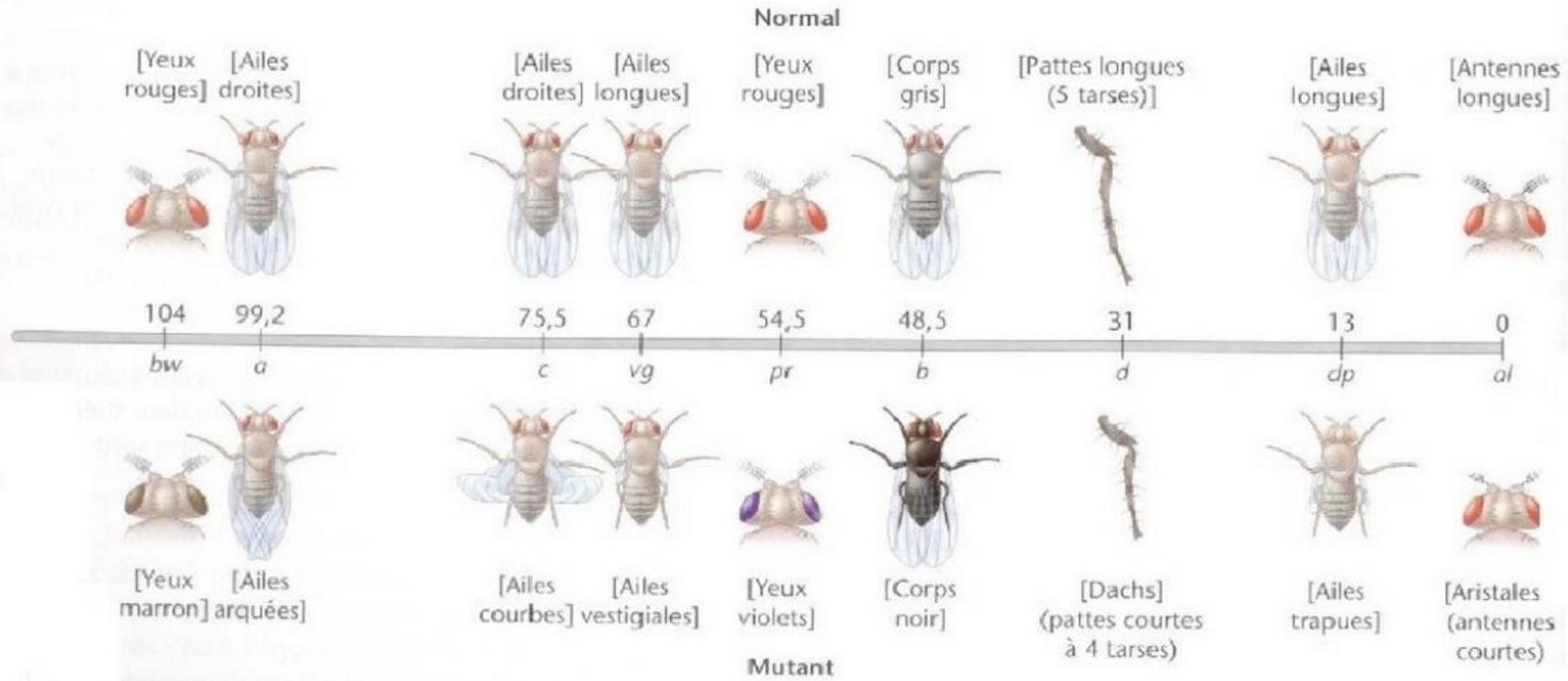
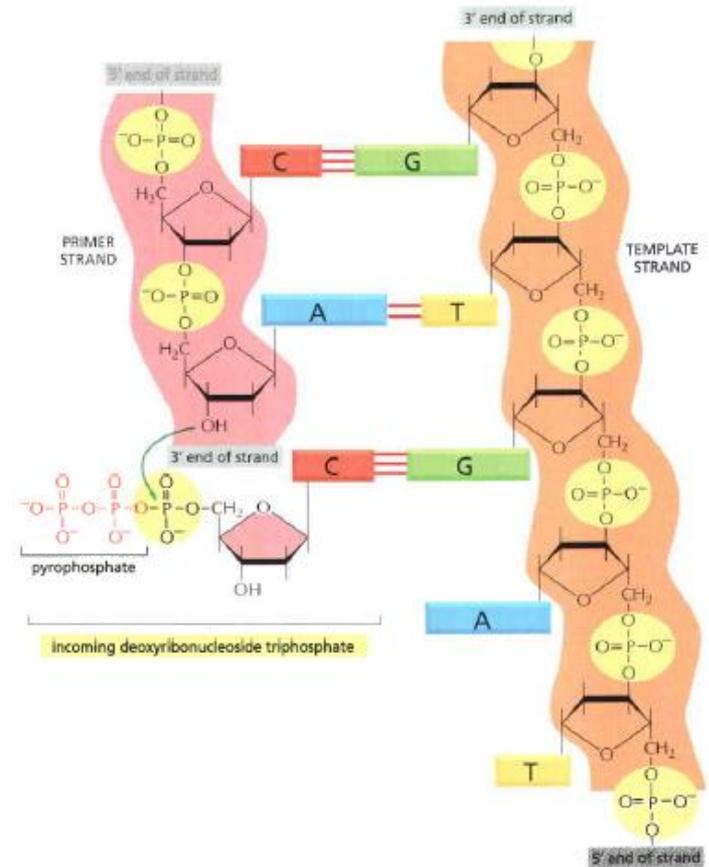
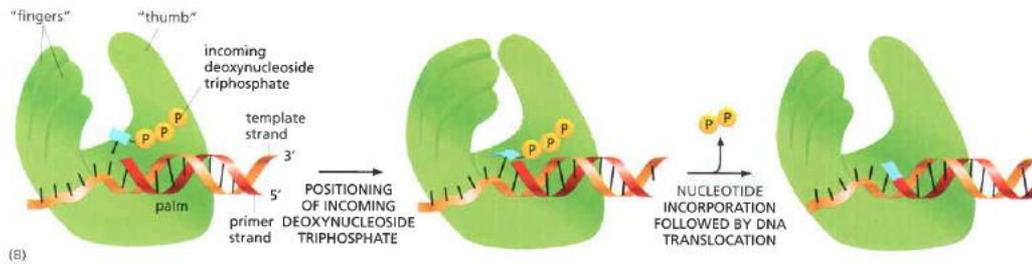
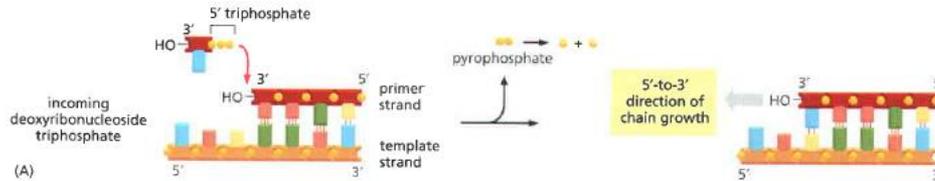
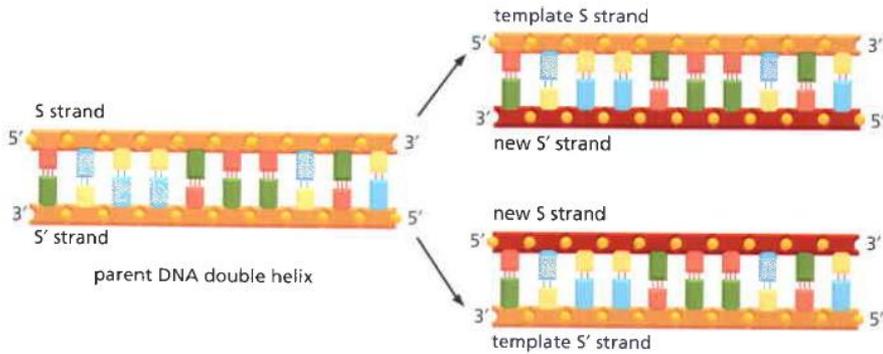
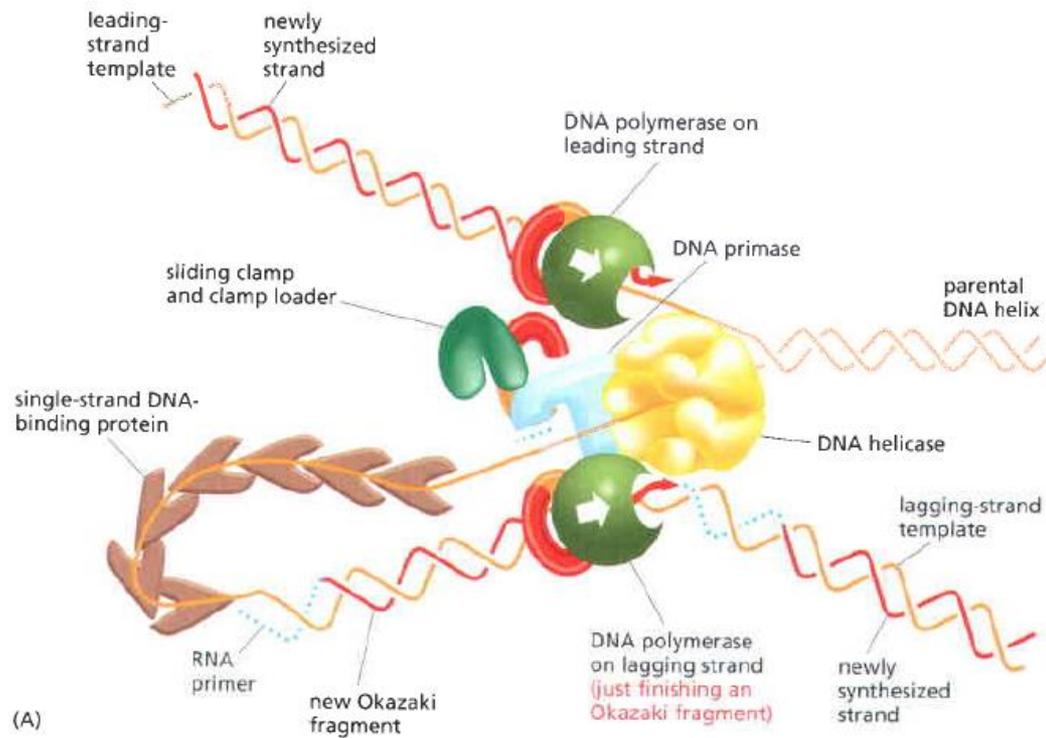
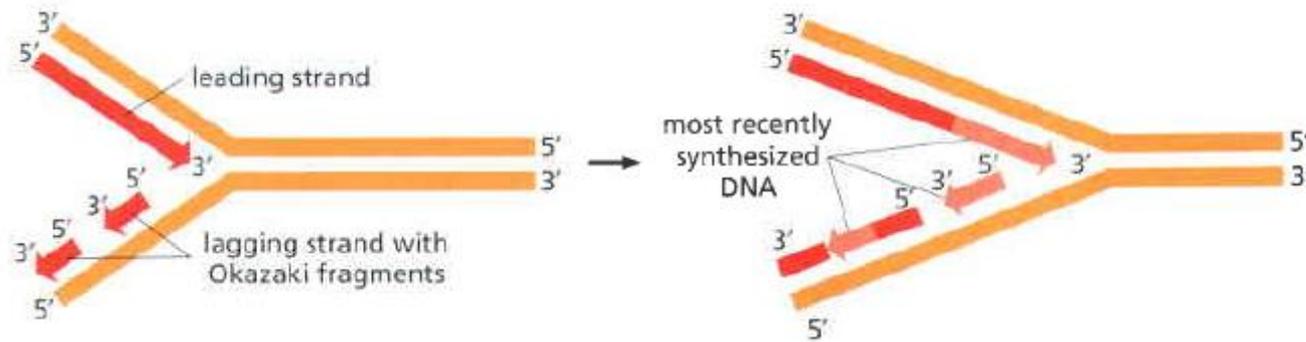


FIGURE 1.9 Le centromère (ci) et les gènes (à droite) sur un chromosome.

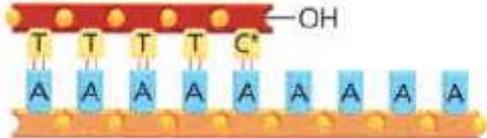
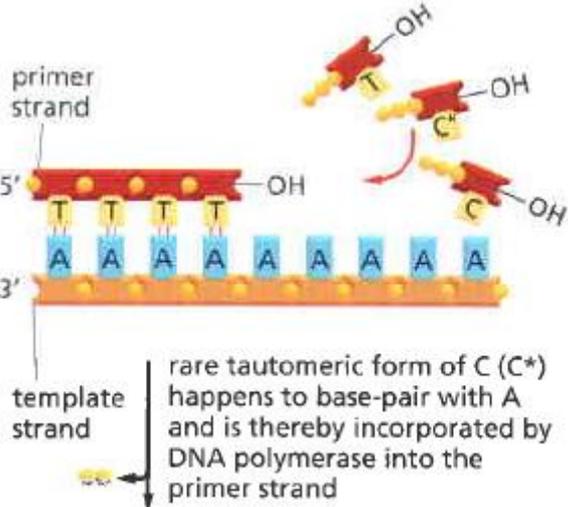
La réplication de l'ADN



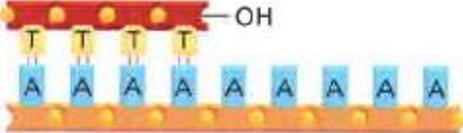
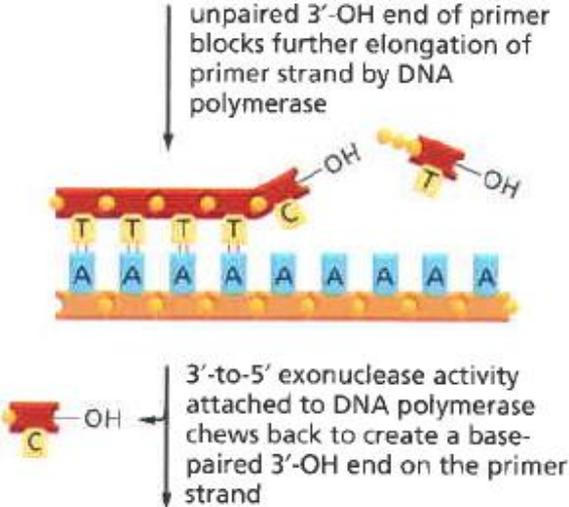
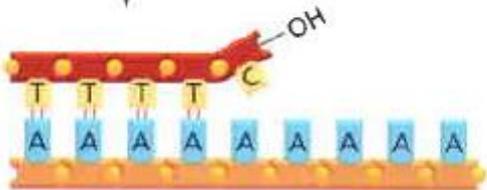
La réplication de l'ADN



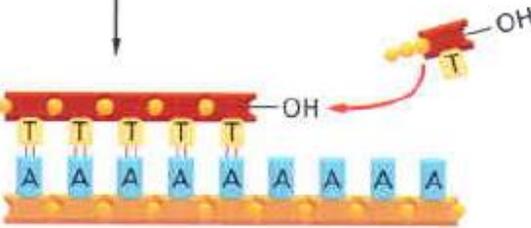
Proof redading



rapid tautomeric shift of C* to normal cytosine (C) destroys its base-pairing with A



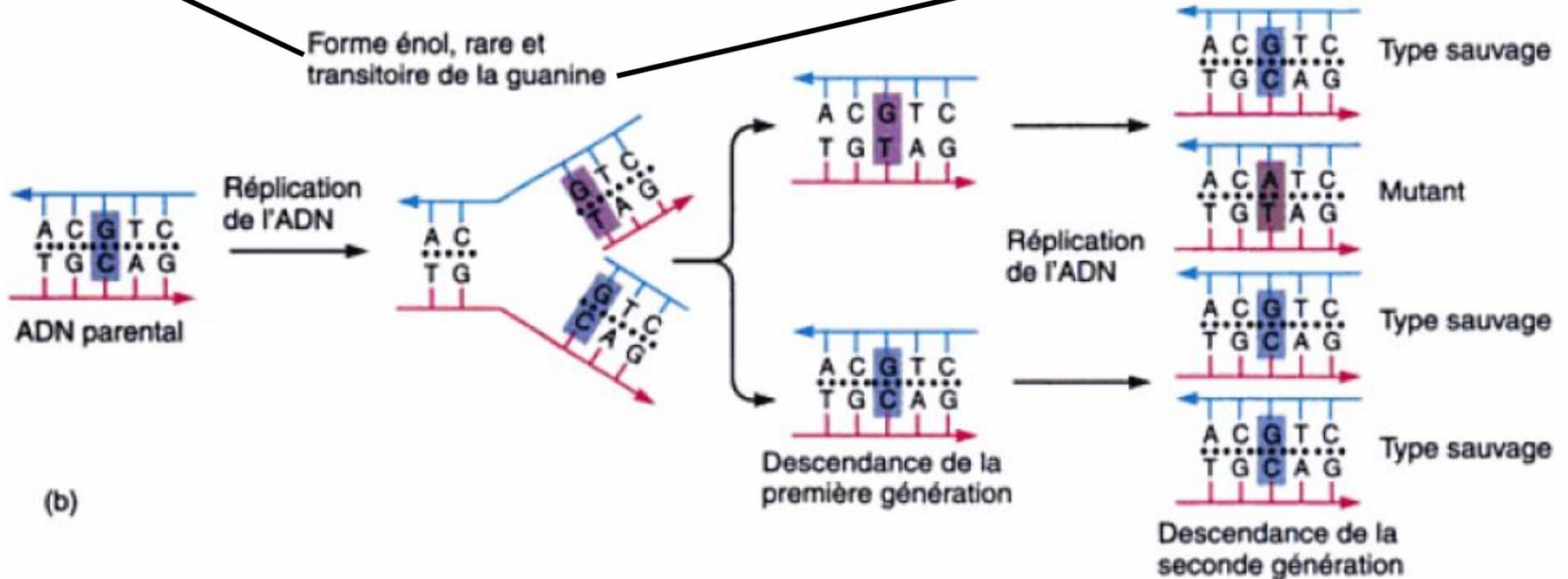
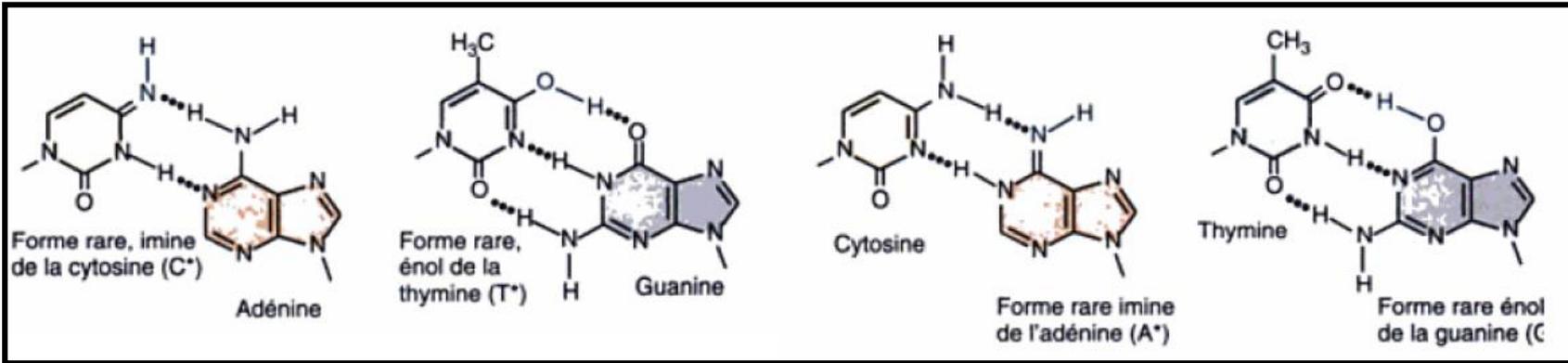
DNA polymerase continues the process of adding nucleotides to the base-paired 3'-OH end of the primer strand



Mutation spontanée: Certaines DNA pol ne possèdent pas d'activité de correction

Table 15.2 DNA Polymerase Families		
Family	Example(s)	Functions/Comments
A	Bacterial DNA polymerase I	Replacement of RNA primers present in Okazaki fragments
B	Archaeal DNA polymerase B (Pol B) Eukaryotic DNA polymerases α , δ , and ϵ	Replicative DNA polymerases
C	Bacterial DNA polymerase III	Replicative DNA polymerase
D	Archaeal DNA polymerase D (Pol D)	Replicative DNA polymerase in some archaea; unique to archaea
X	Eukaryotic DNA polymerase β	DNA repair
Y	Bacterial DNA polymerase IV (Din B)	DNA repair
Reverse transcriptase (RT)	Retroviral reverse transcriptases Telomerase RT	RNA-dependent DNA polymerase

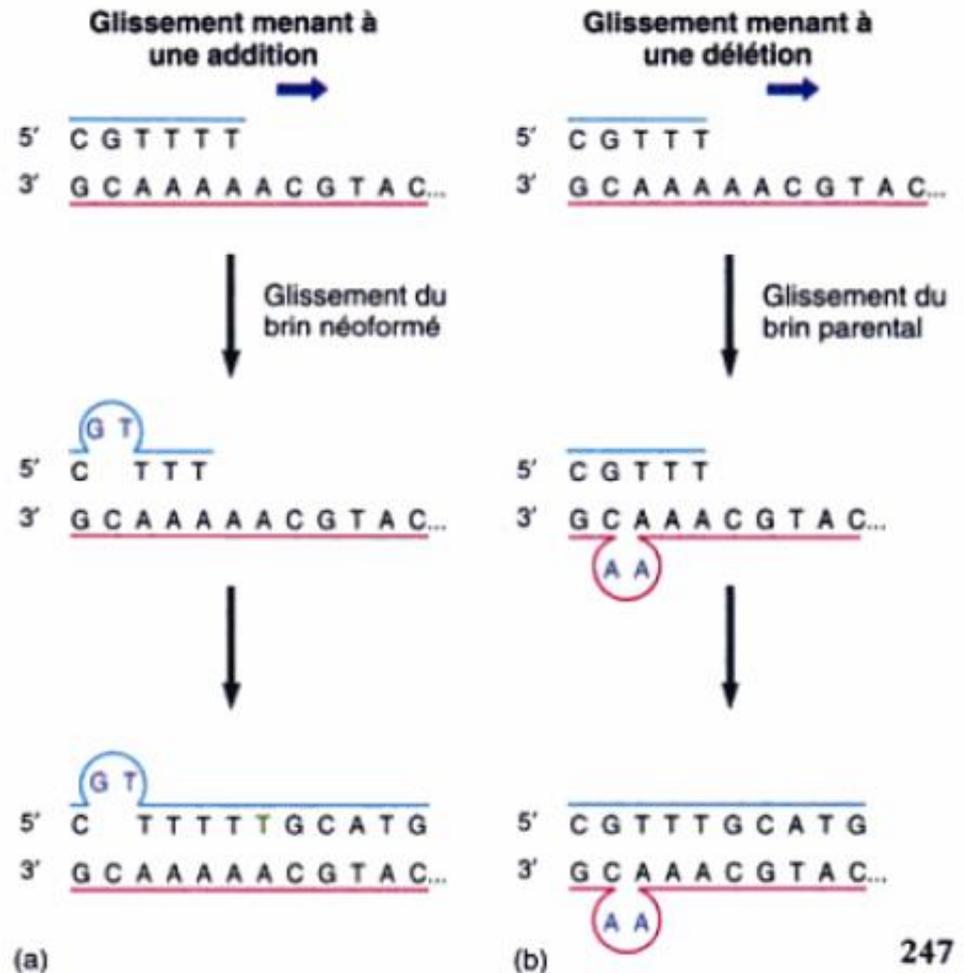
Mutation spontanée: les mutations par transition et transversion



Mutation spontanée: les additions et délétions

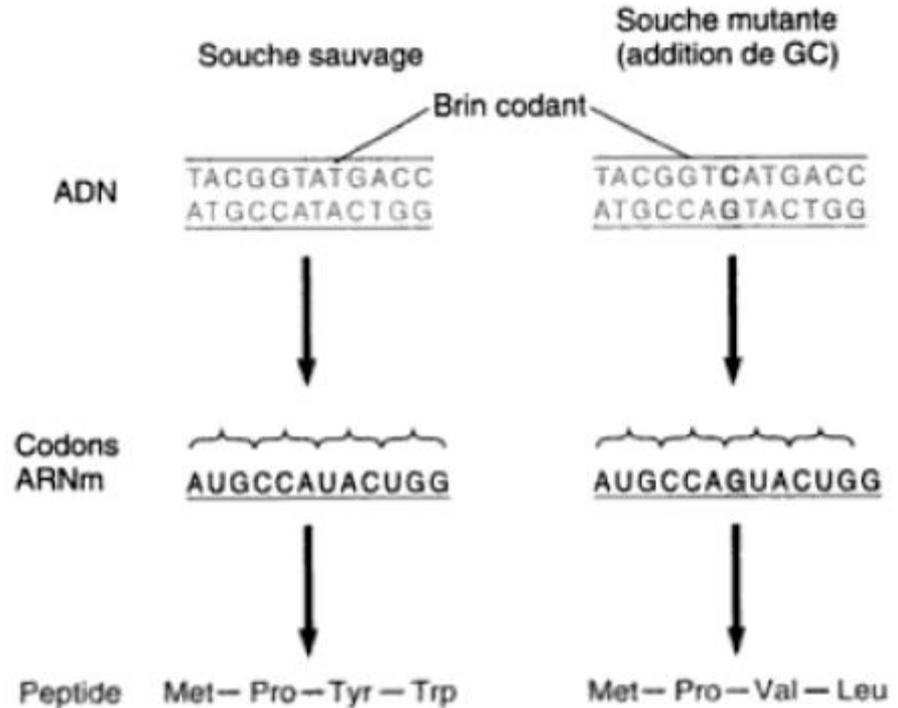
En fonction du brin néoformé ou parental, le glissement produit une addition ou une délétion respectivement lors de la réplication, cela étant due au glissement de l'ADN pol lors de la biosynthèse.

Ce phénomène se produit sur tous dans les régions où les séquences sont répétées.

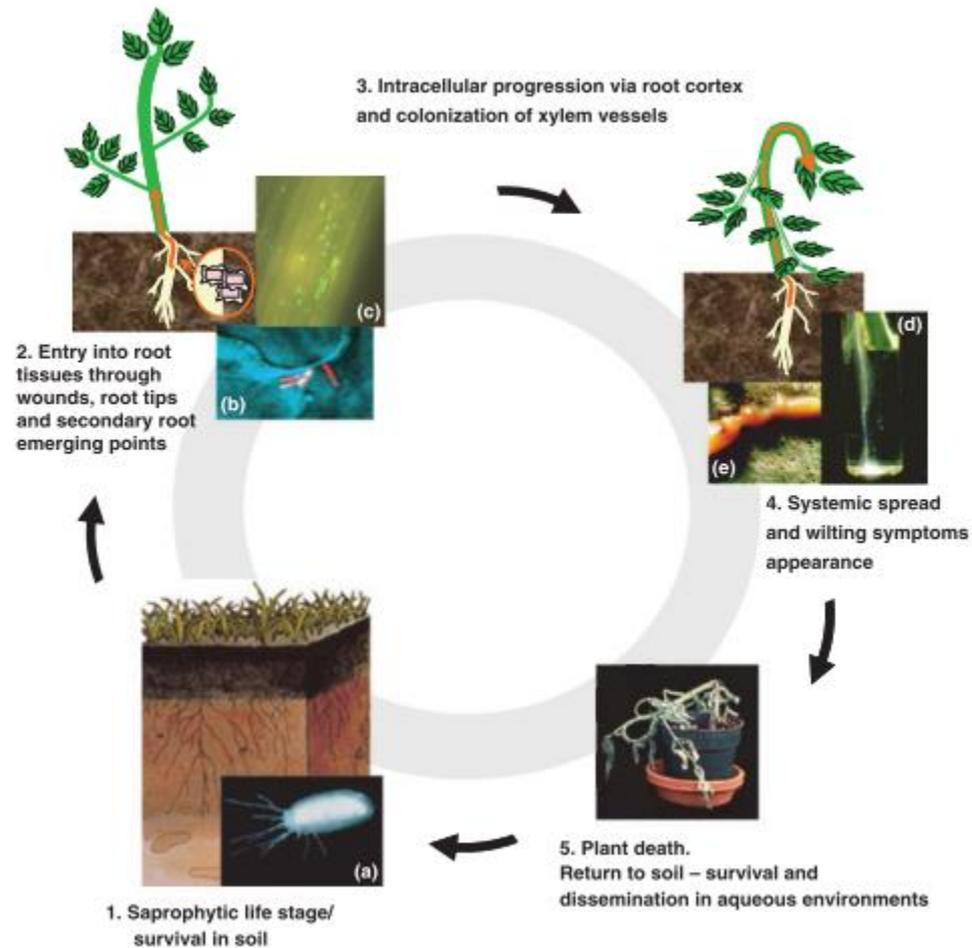


Mutation spontanée: décalage du cadre de lecture

Ce phénomène se produit sur tous dans les régions où les séquences sont répétées. Le taux d'erreur est déterminé par la DNA pol. Peut modifier entièrement une séquence d'acide aminé.

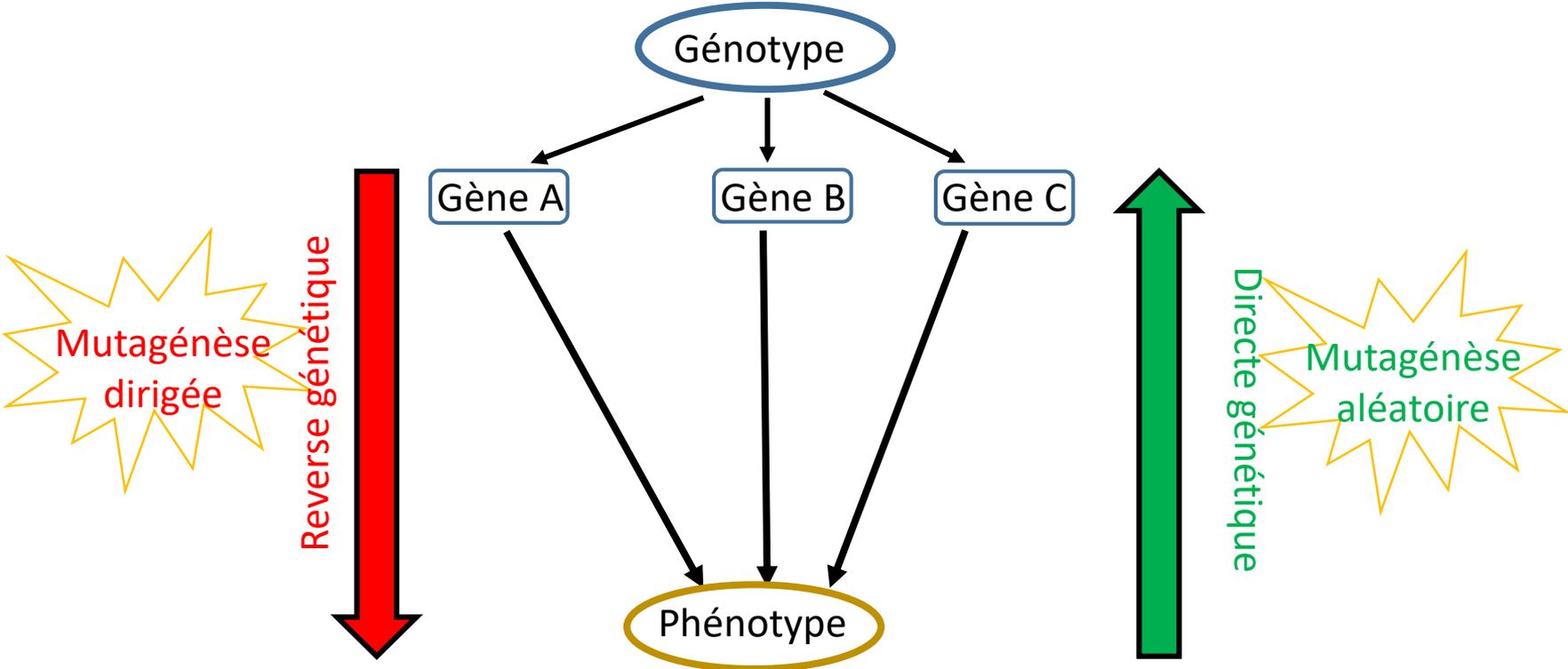


La problématique



**Identifier les mécanismes moléculaire sous-jacent
l'interaction entre *M. tunicatula* et *R. solanacearum***

Stratégie de recherche



Générer des mutants

Mutagenèse Aléatoire (affecte de manière aléatoire les gènes)

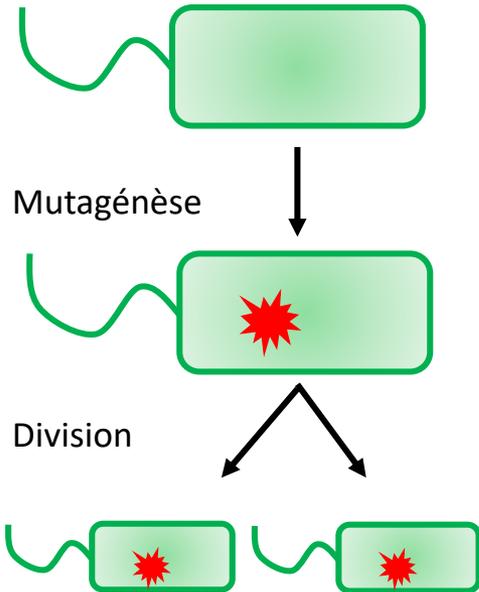
- Par agent chimique exemple : éthyle methanesulfonate (EMS)
- Mutagenèse faste neutron
- Mutagenèse UV
- Mutagenèse par insertion
 - Insertion T-DNA
 - Insertion de transposant

Mutagenèse dirigée (touche de manière ciblée certains gènes)

- Système bactérien
- RNAi
- Ribozyme
- CRISPER-CAS9

Transmission des mutations d'intérêts

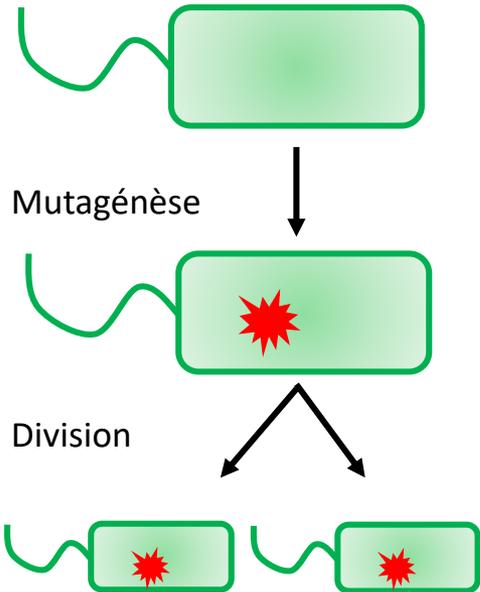
Procaryote/eucaryote unicellulaire



Transmission de la mutation d'intérêt
aux générations descendantes

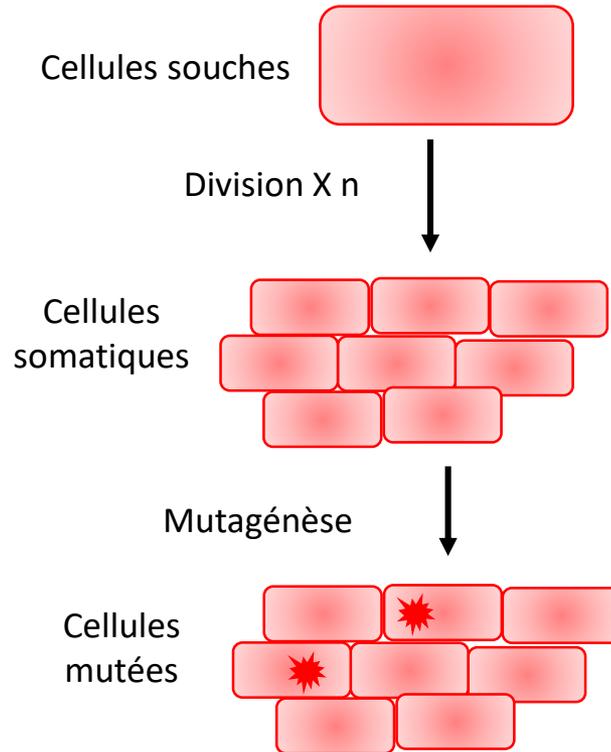
Transmission des mutations d'intérêts

Procaryote/eucaryote unicellulaire



Transmission de la mutation d'intérêt aux générations descendantes

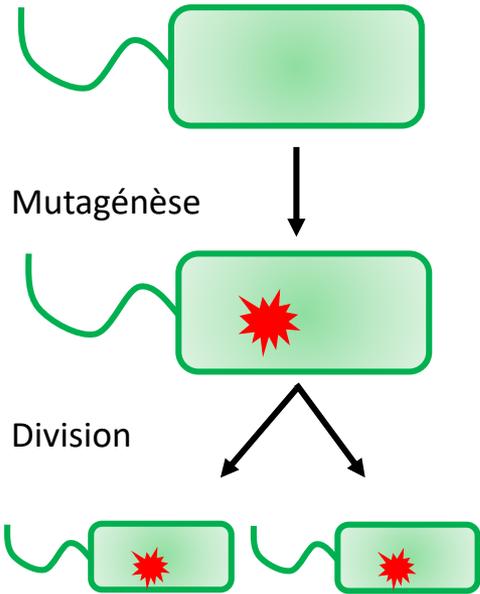
Eucaryote multicellulaire



Transmission de la mutation d'intérêt certaines cellules

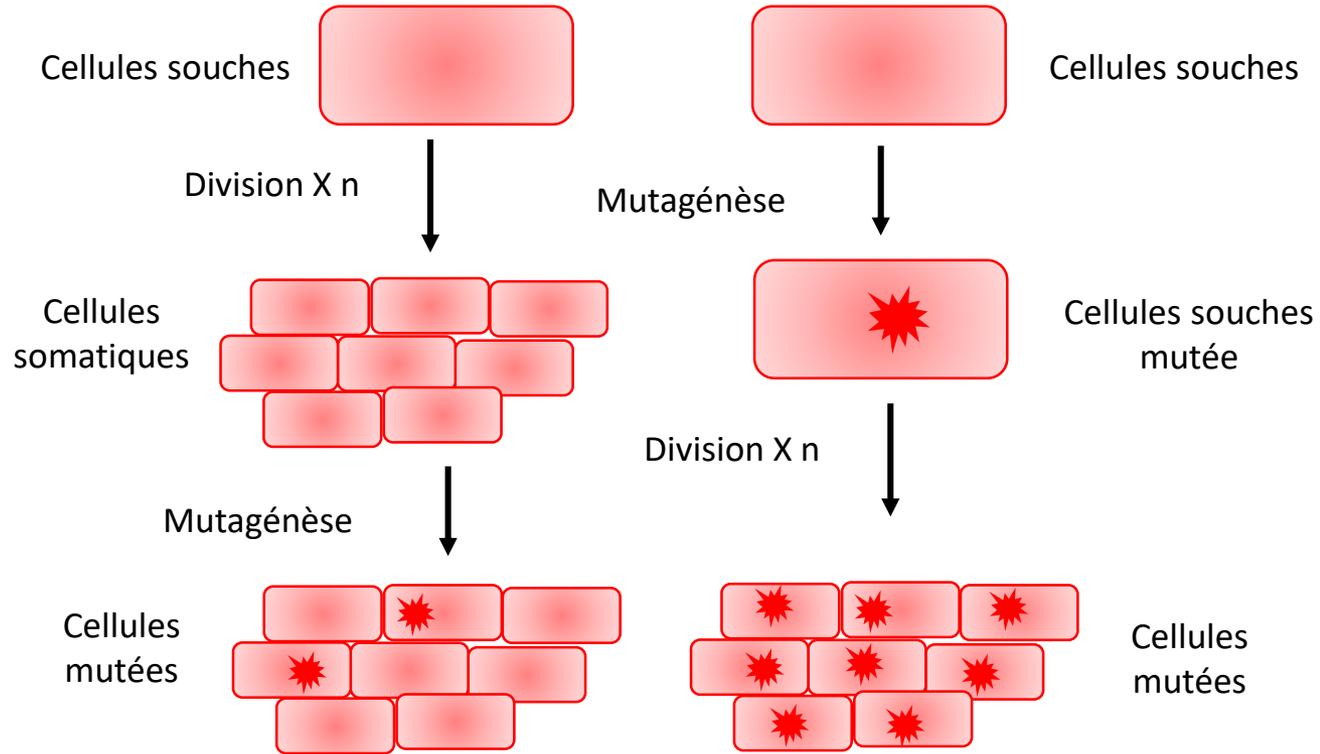
Transmission des mutations d'intérêts

Procaryote/eucaryote unicellulaire



Transmission de la mutation d'intérêt aux générations descendantes

Eucaryote multicellulaire



Transmission de la mutation d'intérêt certaine cellules

Transmission de la mutation d'intérêt à tous l'organisme

Générer des mutants

Mutagenèse Aléatoire (affecte de manière aléatoire les gènes)

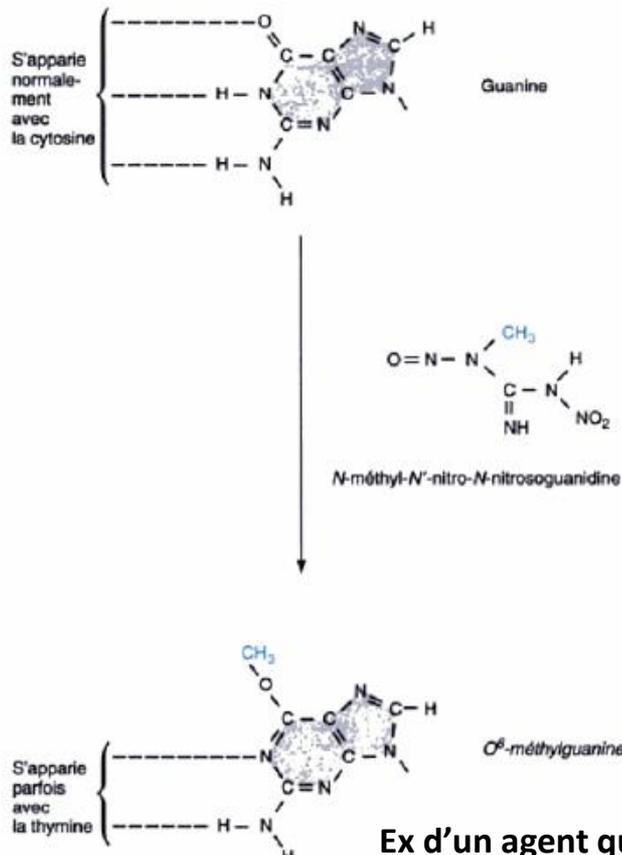
- Par agent chimique exemple éthyle methanesulfonate (EMS)
- Mutagenèse faste neutron
- Mutagenèse UV
- Mutagenèse par insertion
 - Insertion T-DNA
 - Insertion de transposant

Mutagenèse dirigée (touche de manière ciblée certains gènes)

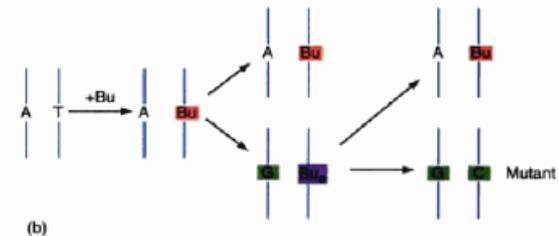
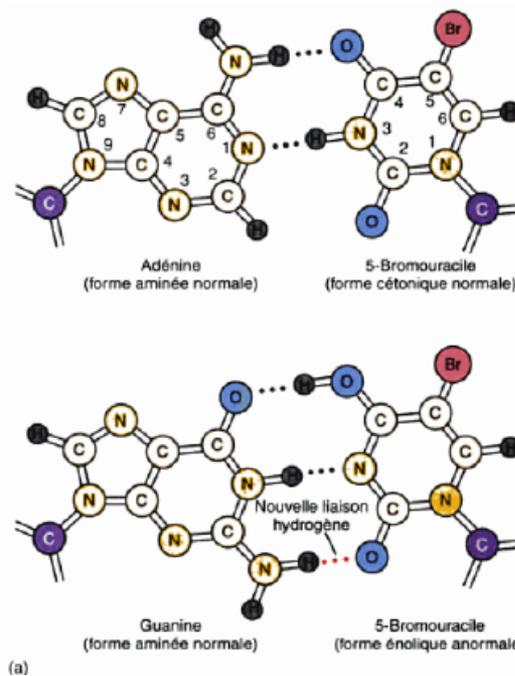
- Système bactérien
- RNAi
- Ribozyme
- CRISPER-CAS9

La mutagénèse par agent chimique

- Mutagénèse chimique réalisée grâce à l'agent mutagène chimique.
- 3 catégories de mutagène chimique : Mime une base azoté, modifie une base azoté, intercalant de l'ADN.
- - Mutagénèse ponctuelles transformant des bases chimiques.
- Modification des appariements des bases chimiques (mutation par transversion et transition)



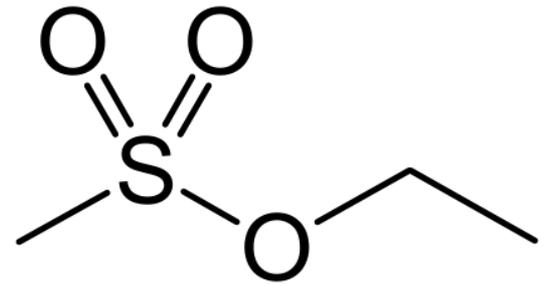
Ex d'un agent qui modifie les bases: Méthyl-nitrosoguanidine



Ex d'un agent qui mime une base azoté: 5-Bromouracil (analogue de T)

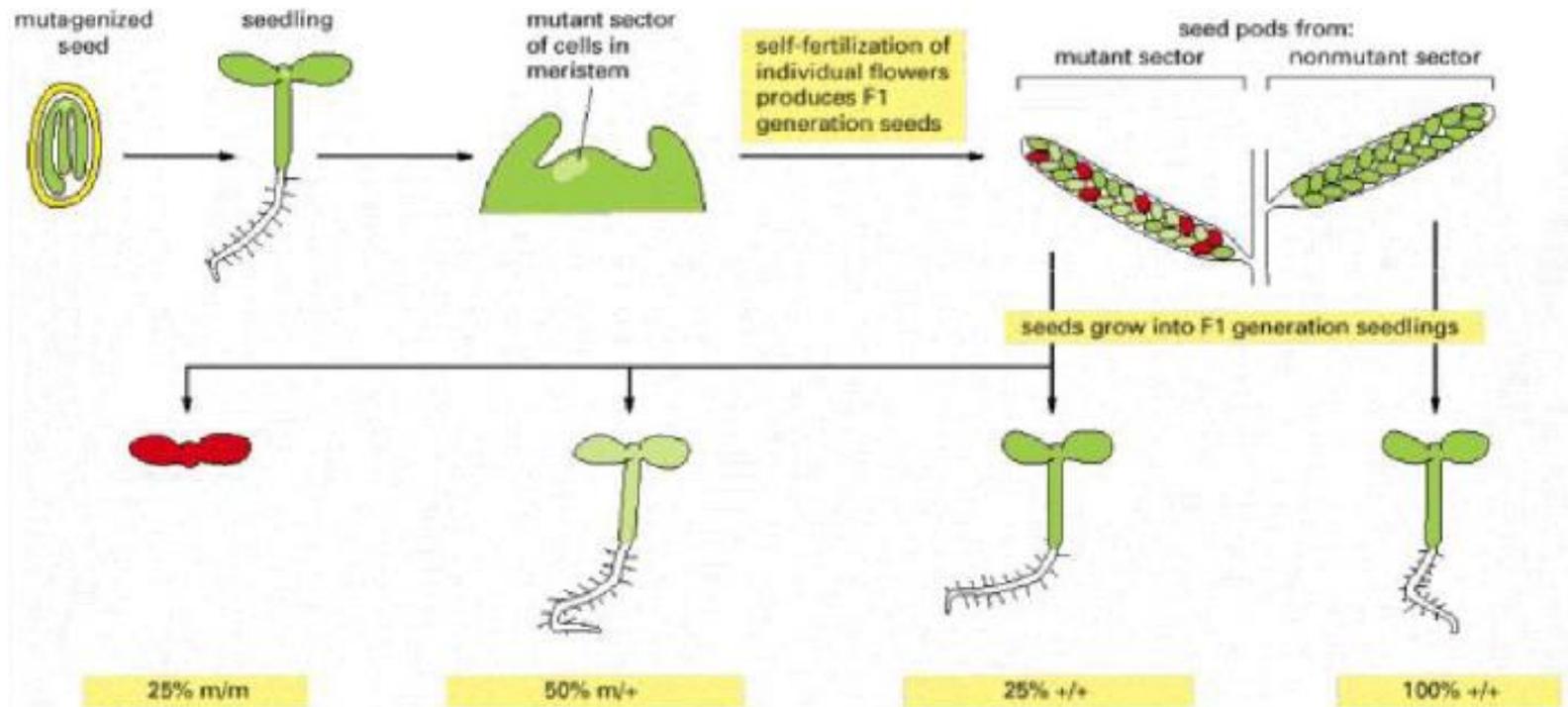
La mutagénèse EMS

- Le groupement éthyle réagit avec la guanine et provoque la formation de O-6-ethylGuanine qui interagit avec Thymine.
- une fréquence de l'ordre de 5×10^{-4} à 5×10^{-2} par gène.



méthanesulfonate d'éthyle

La mutagenèse EMS chez les plantes



Générer des mutants

Mutagenèse Aléatoire (affecte de manière aléatoire les gènes)

- éthyle methanesulfonate (EMS)
- **Mutagenèse faste neutron**
- Mutagenèse UV
- Mutagenèse par insertion
 - Insertion T-DNA
 - Insertion de transposant

Mutagenèse dirigée (touche de manière ciblée certains gènes)

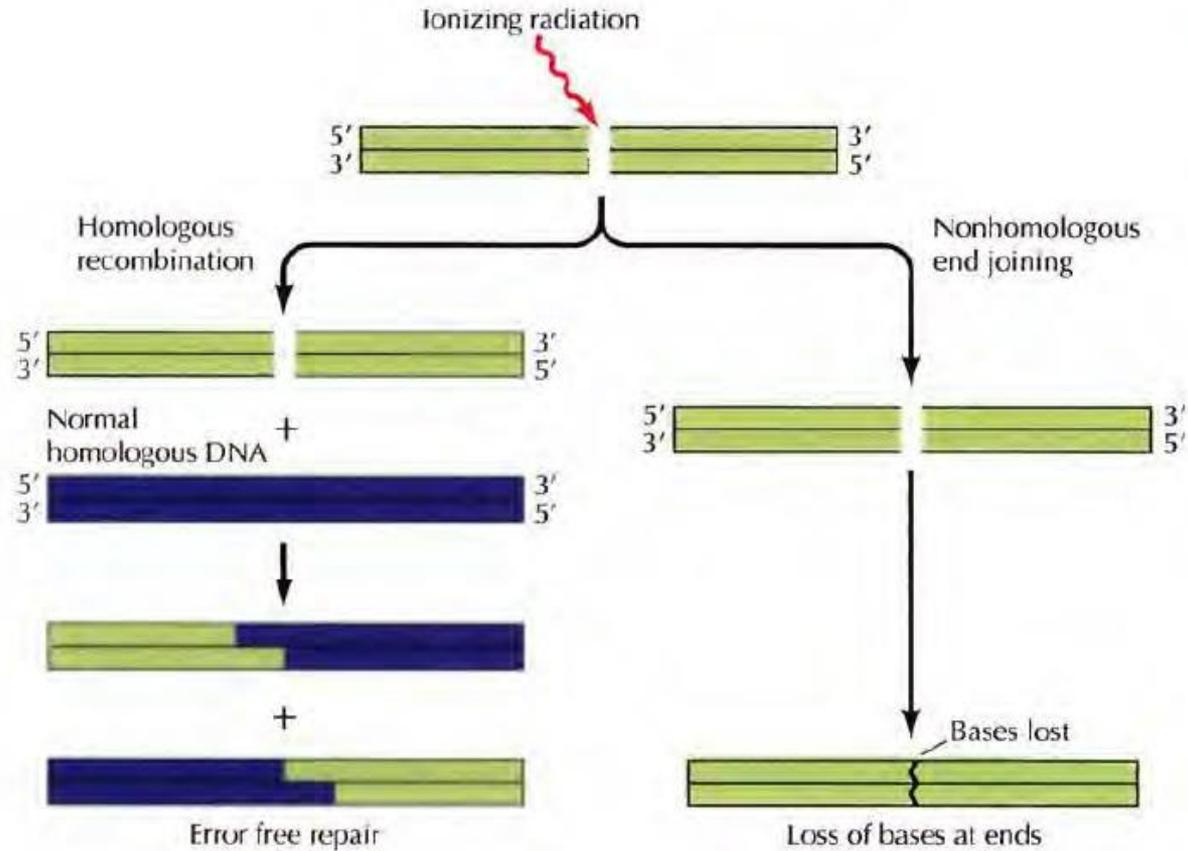
- Système bactérien
- RNAi
- Ribozyme
- CRISPER-CAS9

La mutagénèse rapide neutron

Cette mutagénèse est obtenue grâce au bombardement par un canon à particule des cellules.

Elle provoque des délétions dans le génomes.

Réparation des cassure d'ADN



Générer des mutants

Mutagenèse Aléatoire (affecte de manière aléatoire les gènes)

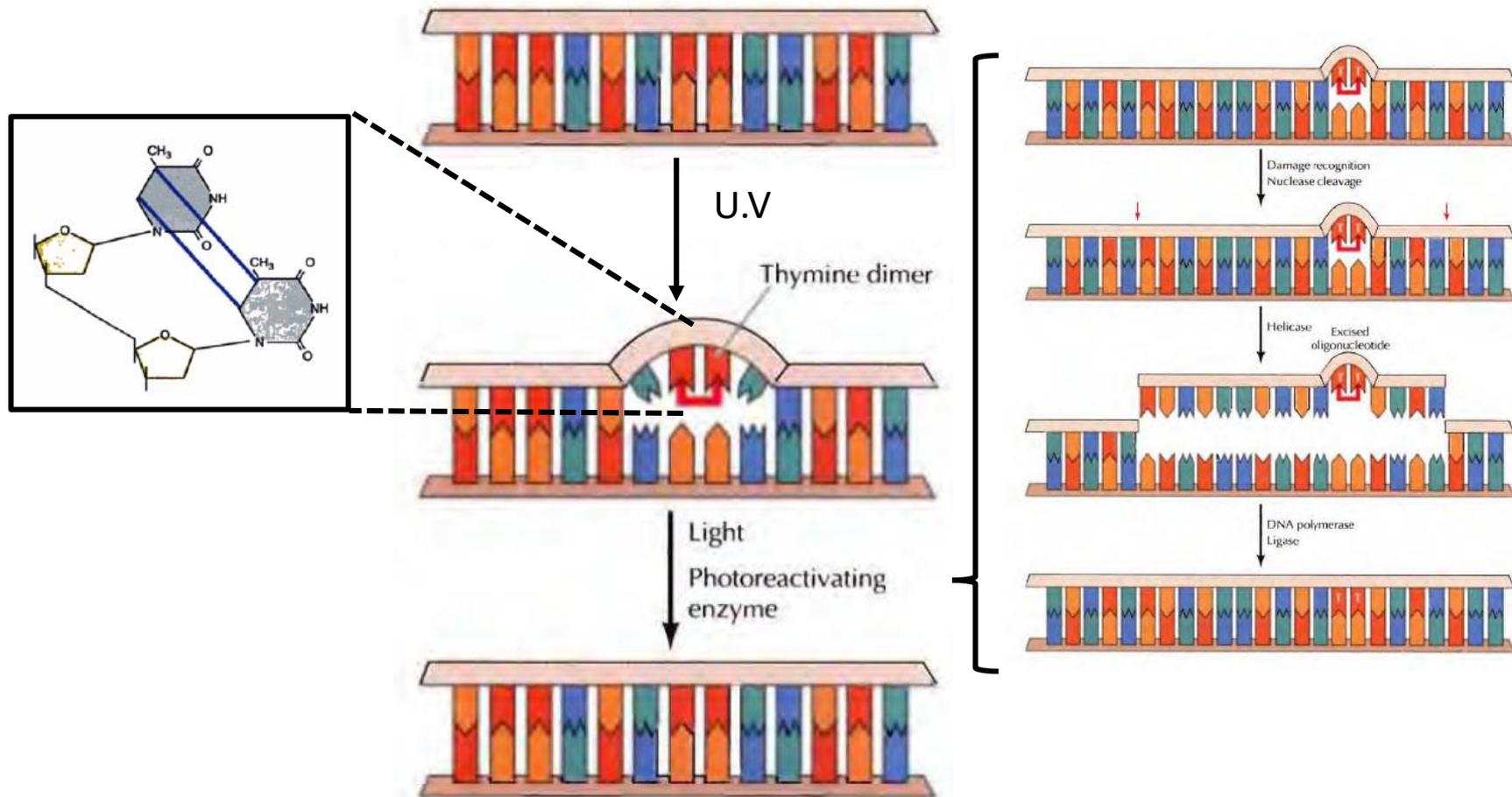
- éthyle methanesulfonate (EMS)
- Mutagenèse rapide neutron
- **Mutagenèse UV**
- Mutagenèse par insertion
 - Insertion T-DNA
 - Insertion de transposant

Mutagenèse dirigée (touche de manière ciblée certains gènes)

- Système bactérien
- RNAi
- Ribozyme
- CRISPER-CAS9

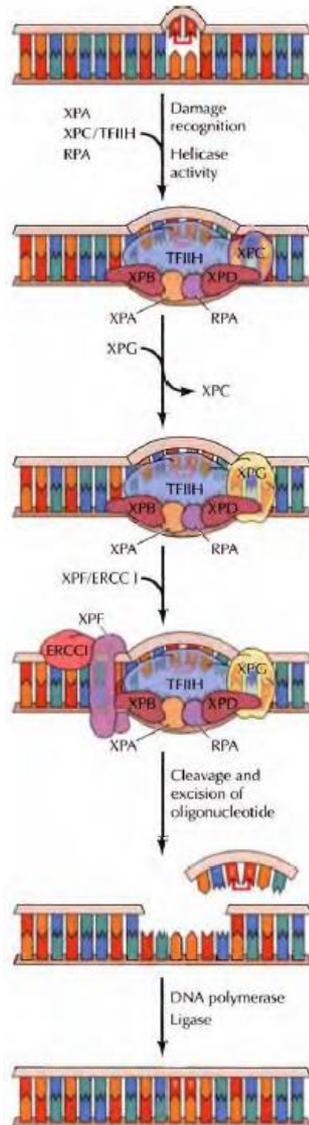
La mutagénèse U.V

Utilisée sur tous en laboratoire pour la désinfection des surfaces exposées aux agents microbiens.

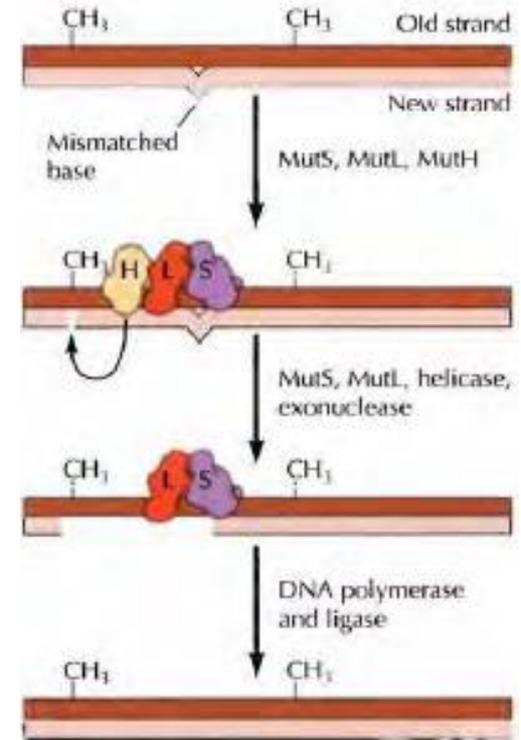


La mutagénèse U.V

Système de réparation chez les mammifère



Système de réparation chez E-coli



Générer des mutants

Mutagenèse Aléatoire (affecte de manière aléatoire les gènes)

- éthyle methanesulfonate (EMS)
- Mutagenèse faste neutron
- Mutagenèse UV
- Mutagenèse par insertion
 - Insertion T-DNA
 - Insertion de transposant

Mutagenèse dirigée (touche de manière ciblée certains gènes)

- Système bactérien
- Système fongique
- CRISPER-CAS9

La mutagénèse par insertion

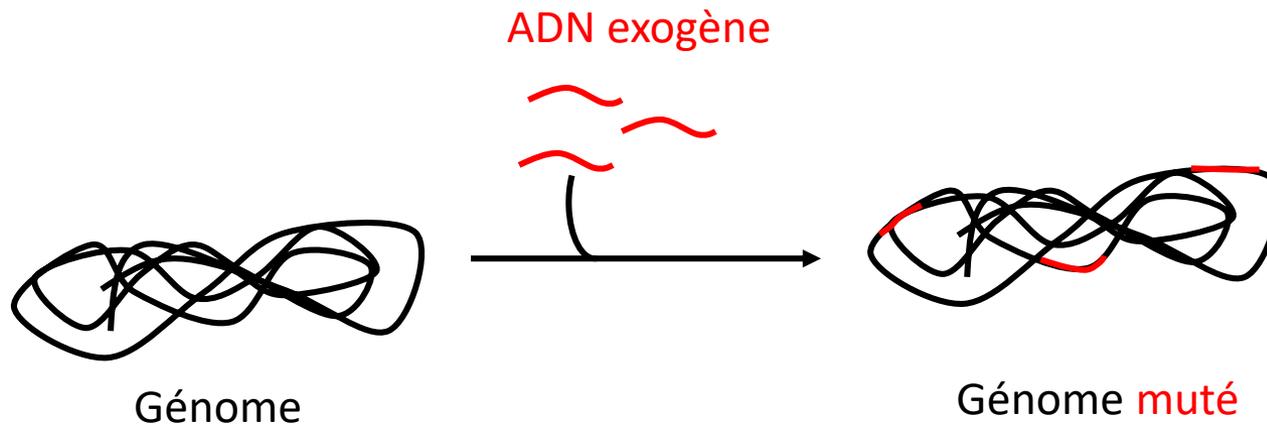
Consiste à insérer des fragments d'ADN exogènes dans le génome.

Elle fait appelle essentiellement aux techniques de transformation utilisées en biologie moléculaire (**chapitre 3**).

En fonction de la nature de l'ADN inséré en distingue :

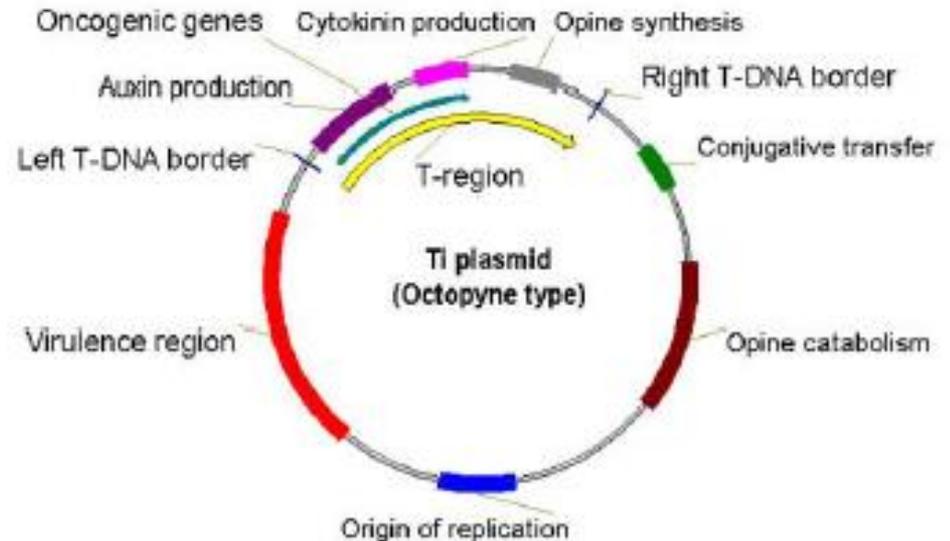
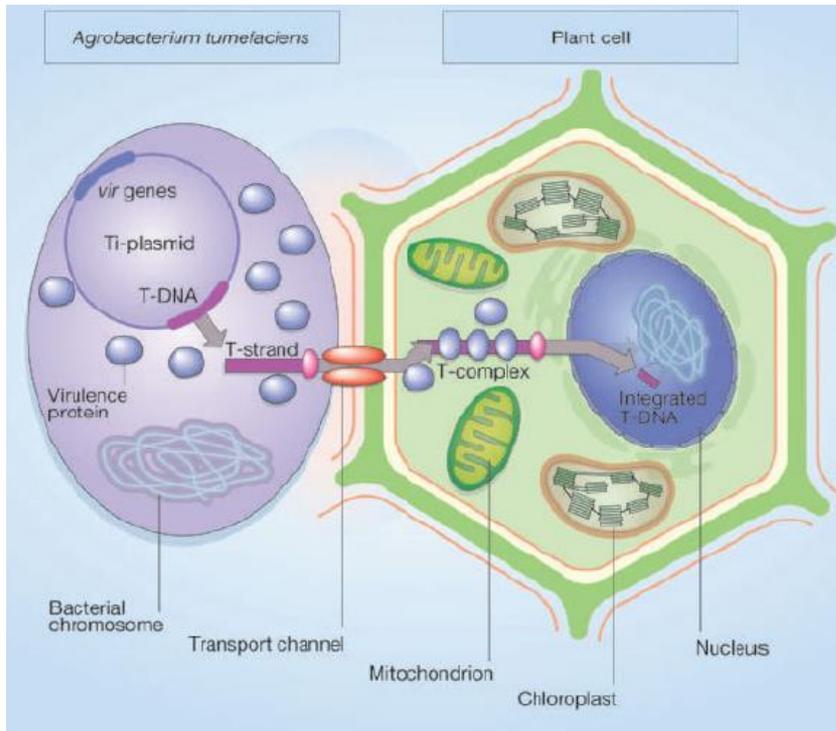
Mutagénèse T-DNA

Mutagénèse au transposant.

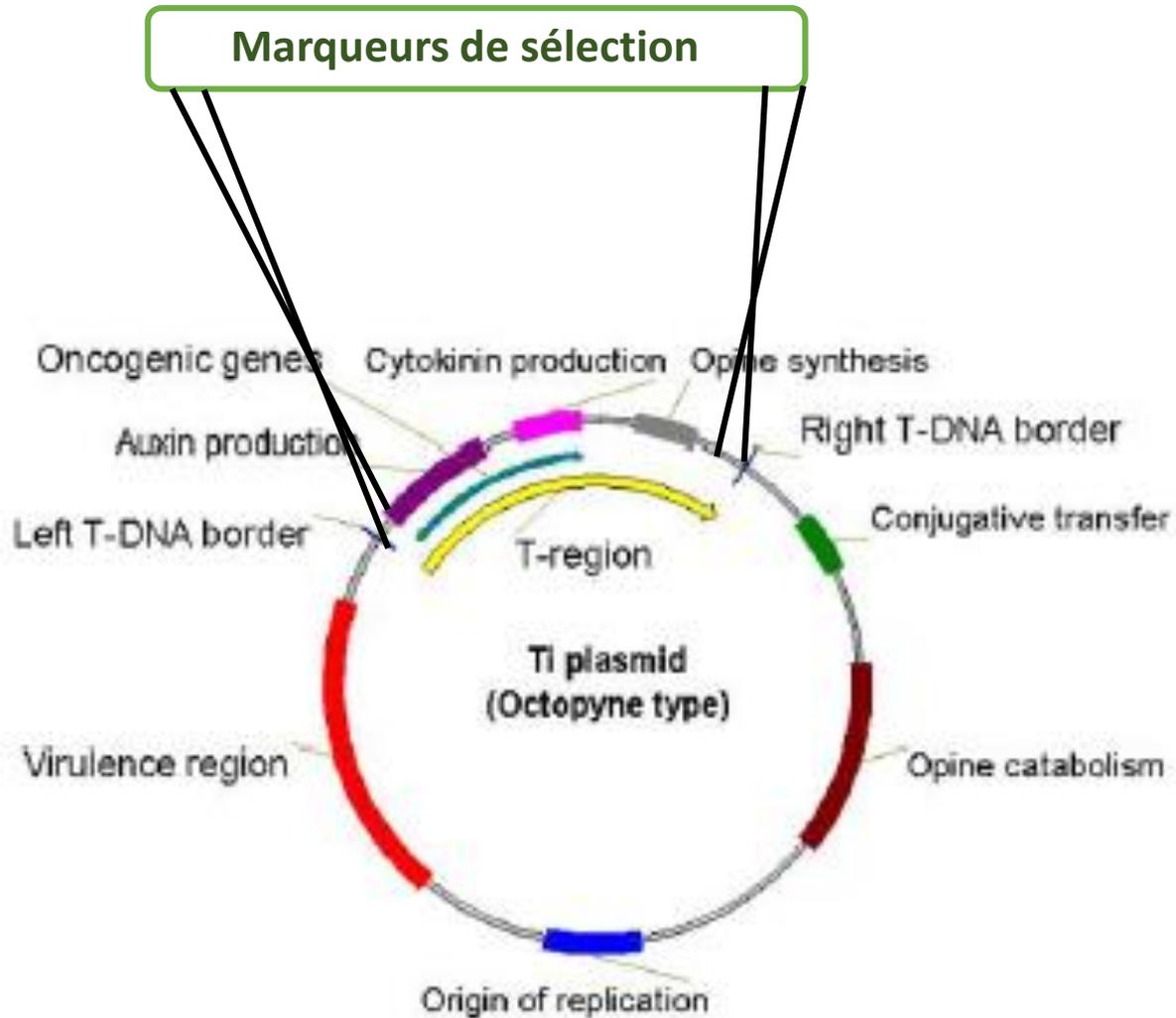


La mutagénèse par insertion T-DNA

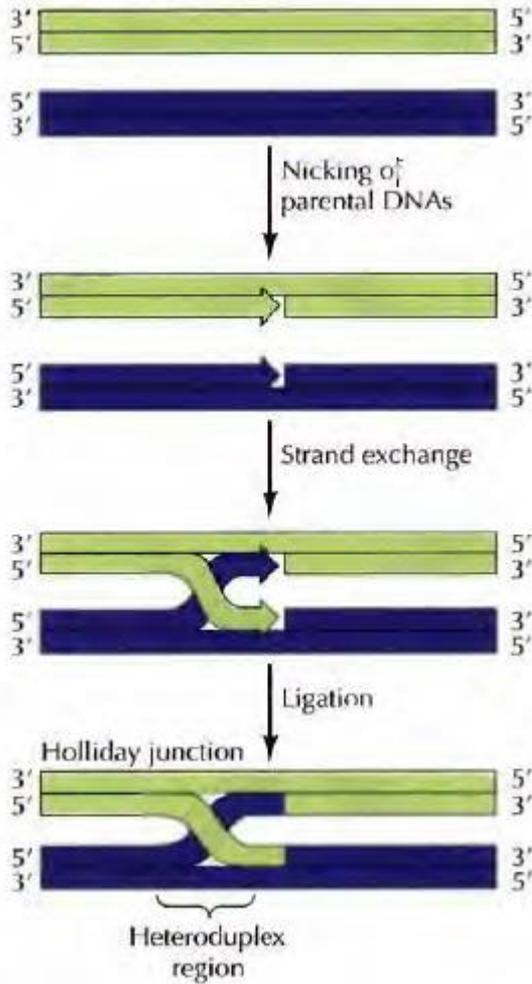
Utilisation du plasmide d'*Agrobacterium tumefaciens*



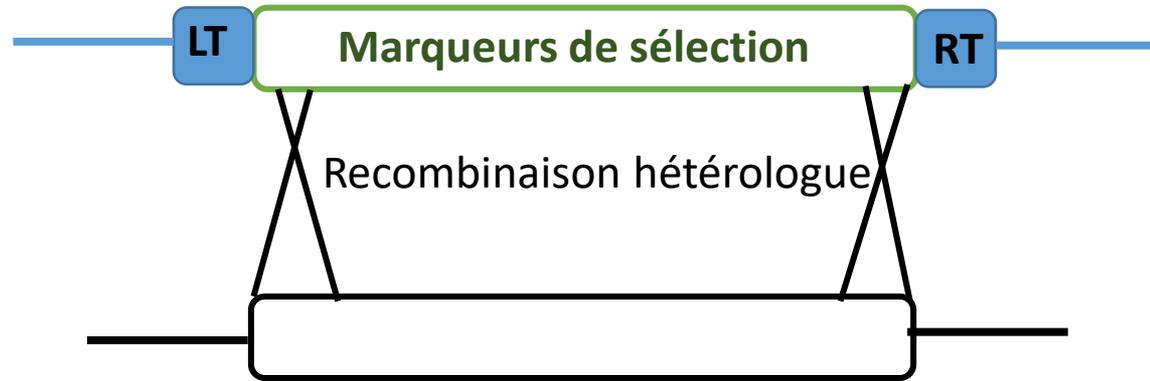
La mutagénèse par insertion T-DNA



La mutagénèse par insertion T-DNA



Plasmide T



Recombinaison hétérologue

Génome

Séparation des tétrades



Générer des mutants

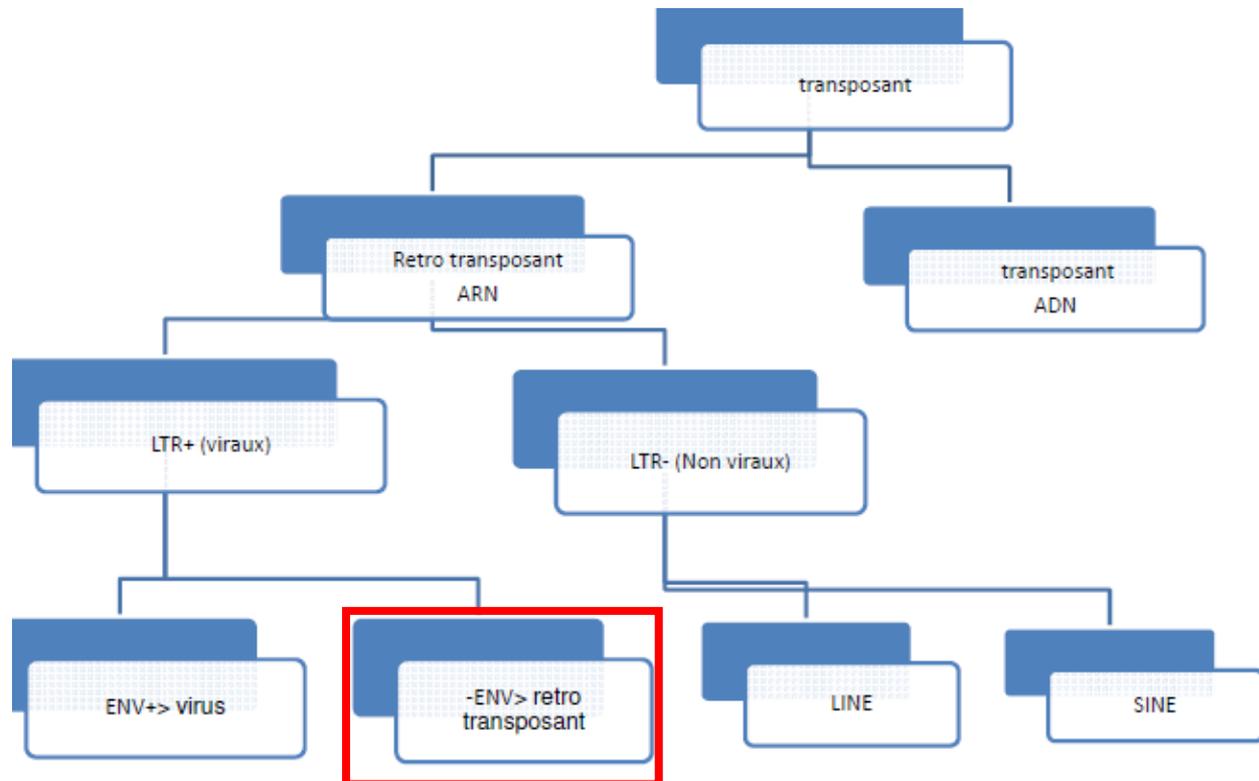
Mutagenèse Aléatoire (affecte de manière aléatoire les gènes)

- éthyle methanesulfonate (EMS)
- Mutagenèse faste neutron
- Mutagenèse UV
- **Mutagenèse par insertion**
 - Insertion T-DNA
 - **Insertion de transposant**

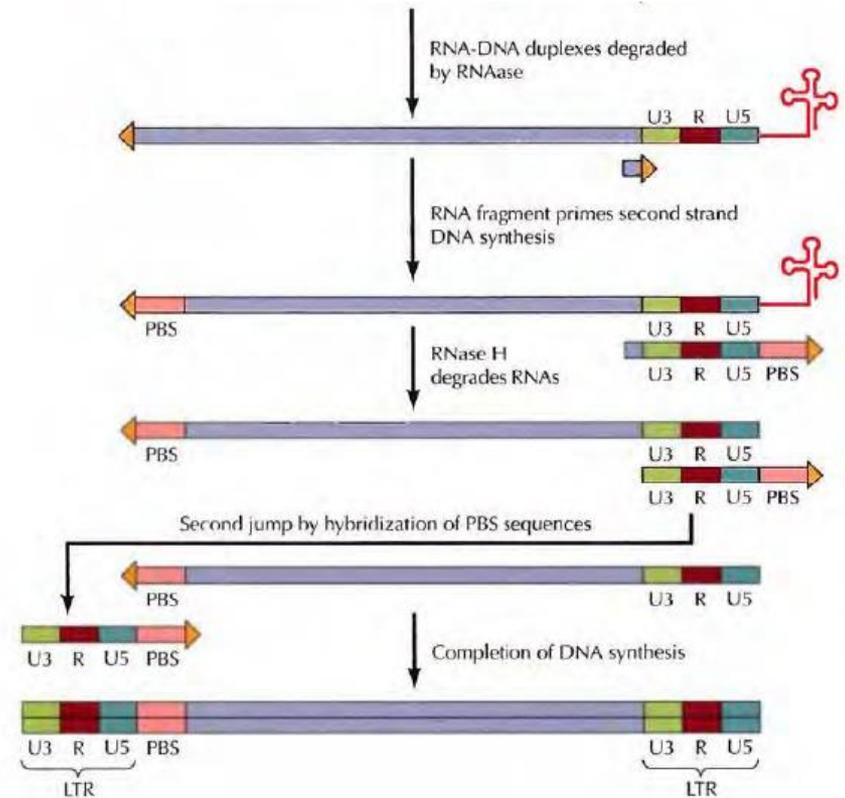
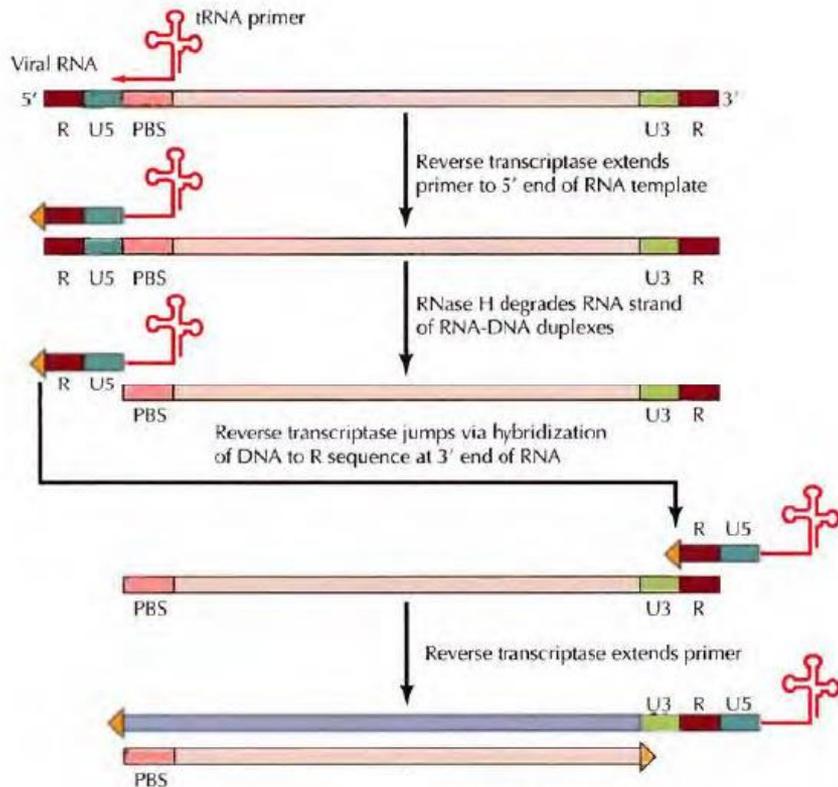
Mutagenèse dirigée (touche de manière ciblée certains gènes)

- Système bactérien
- Système fongique
- CRISPER-CAS9

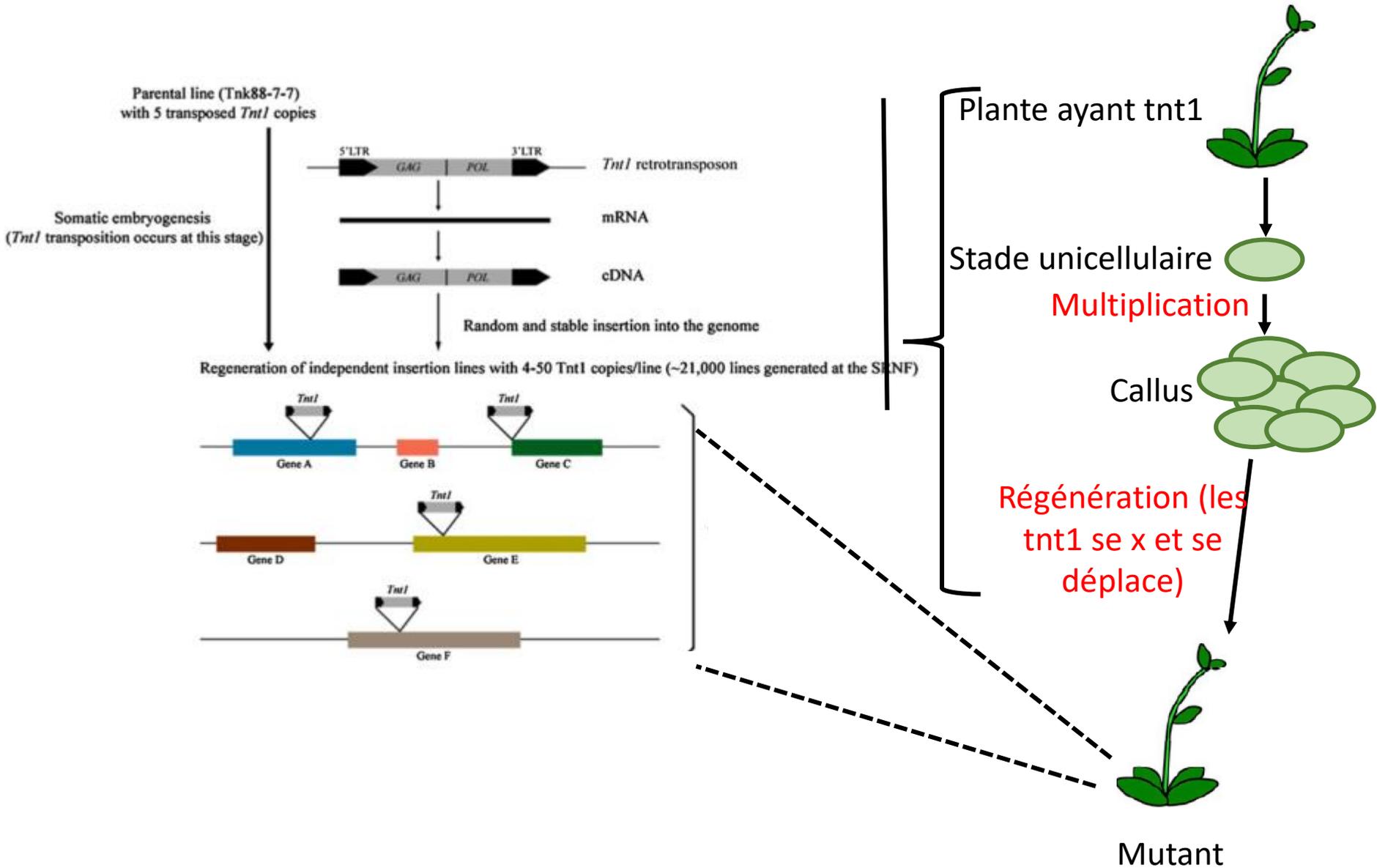
Transposant tnt1



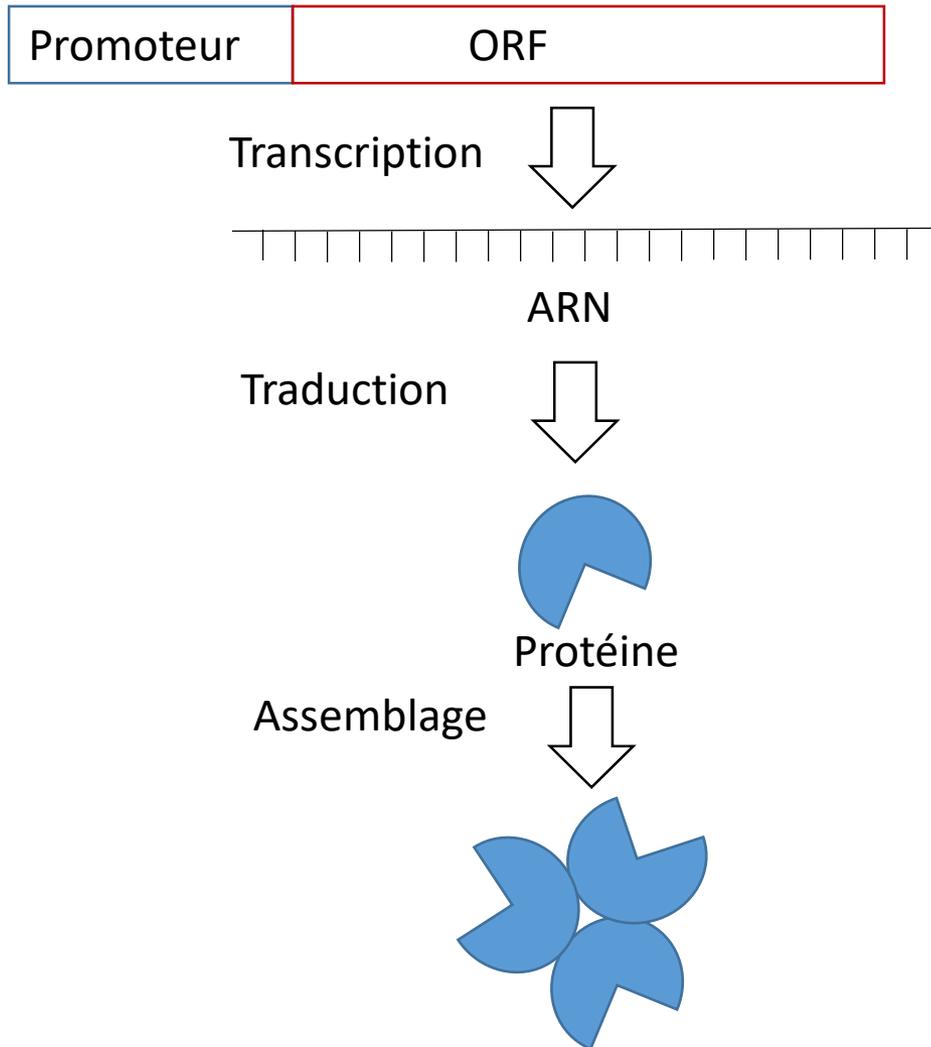
Mode de répliation des retrotransposant



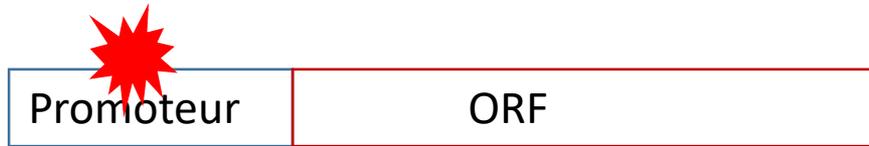
Transposant *tnt1* chez *M. truncatula*



Les différents effets des mutations



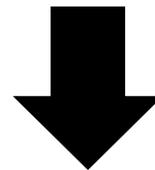
Les différents types de mutations



- Pas d'effet.
- Inactivation du promoteur.
- Modification de l'interaction avec des éléments en trans: augmentation ou réduction de l'affinité des éléments en cis.
- Création de nouveaux CIS éléments.

 Augmentation de l'activité du promoteur

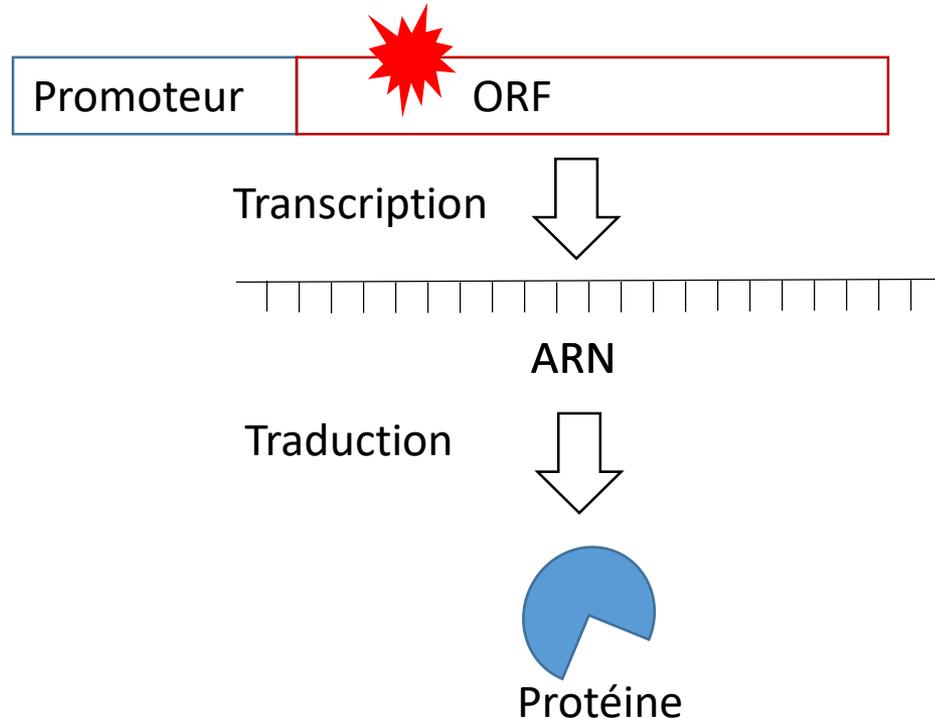
 Réduction de l'activité du promoteur



 Augmentation des transcrits

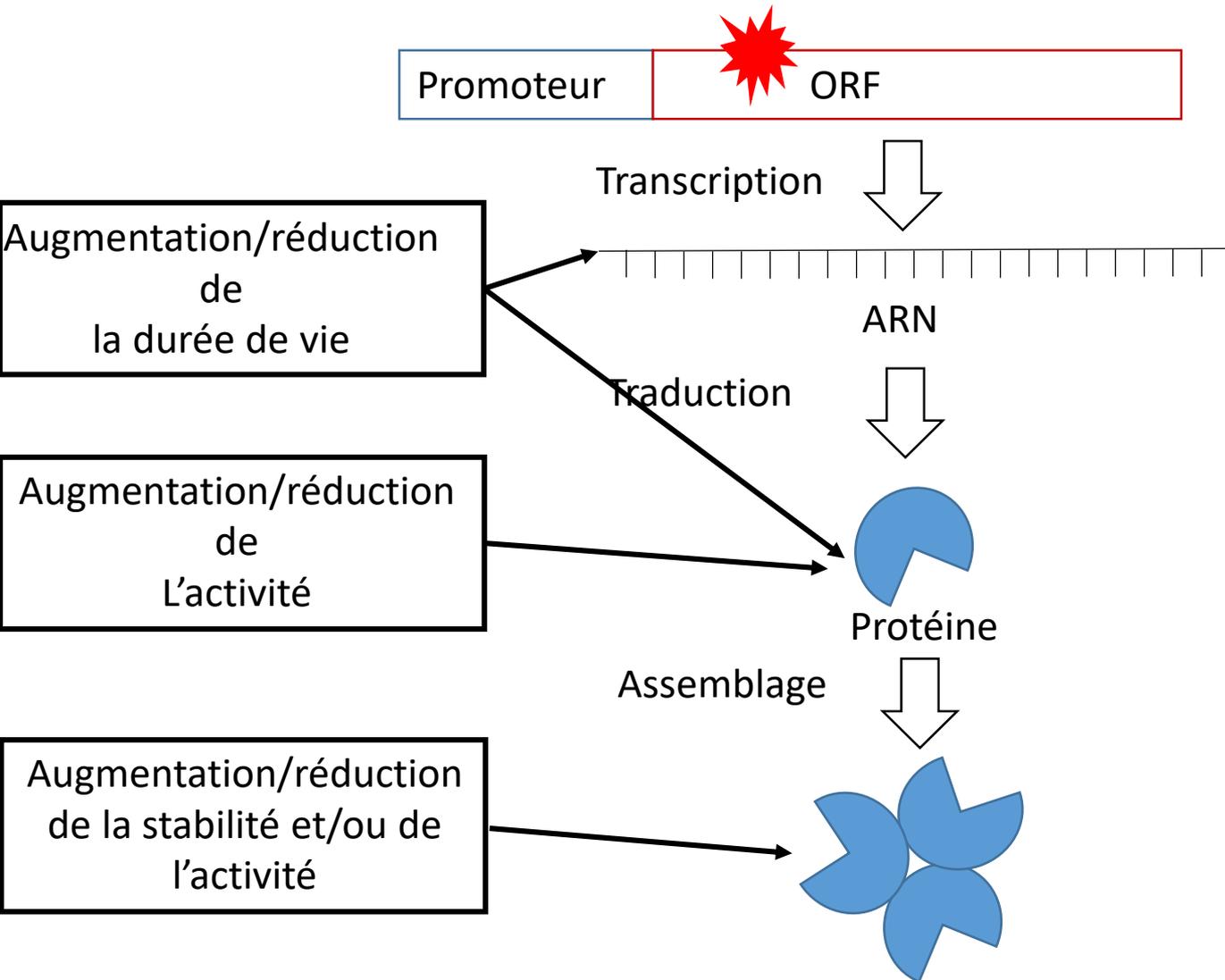
 Réduction des transcrits

Les différents types de mutations

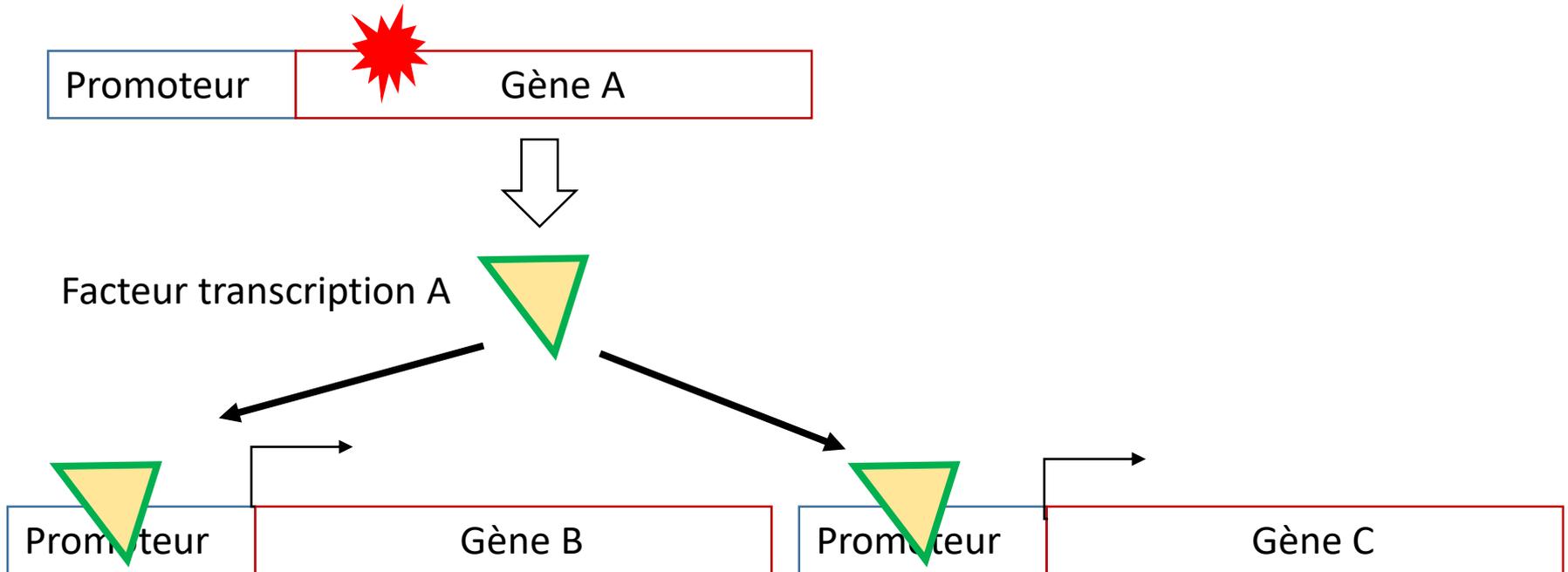


- Mutation silencieuse : n'affecte pas l'acide aminé de la protéine
- Mutation faux sens : change l'acide aminé de la protéine
- Mutation non sens : terminaison prématuré de la traduction (codon stop)
- Mutation de déphasage du cadre de lecture : ajout/réduction d'un ou deux nucléotides.
- Mutation polaire : une région muté et plusieurs gènes affectés

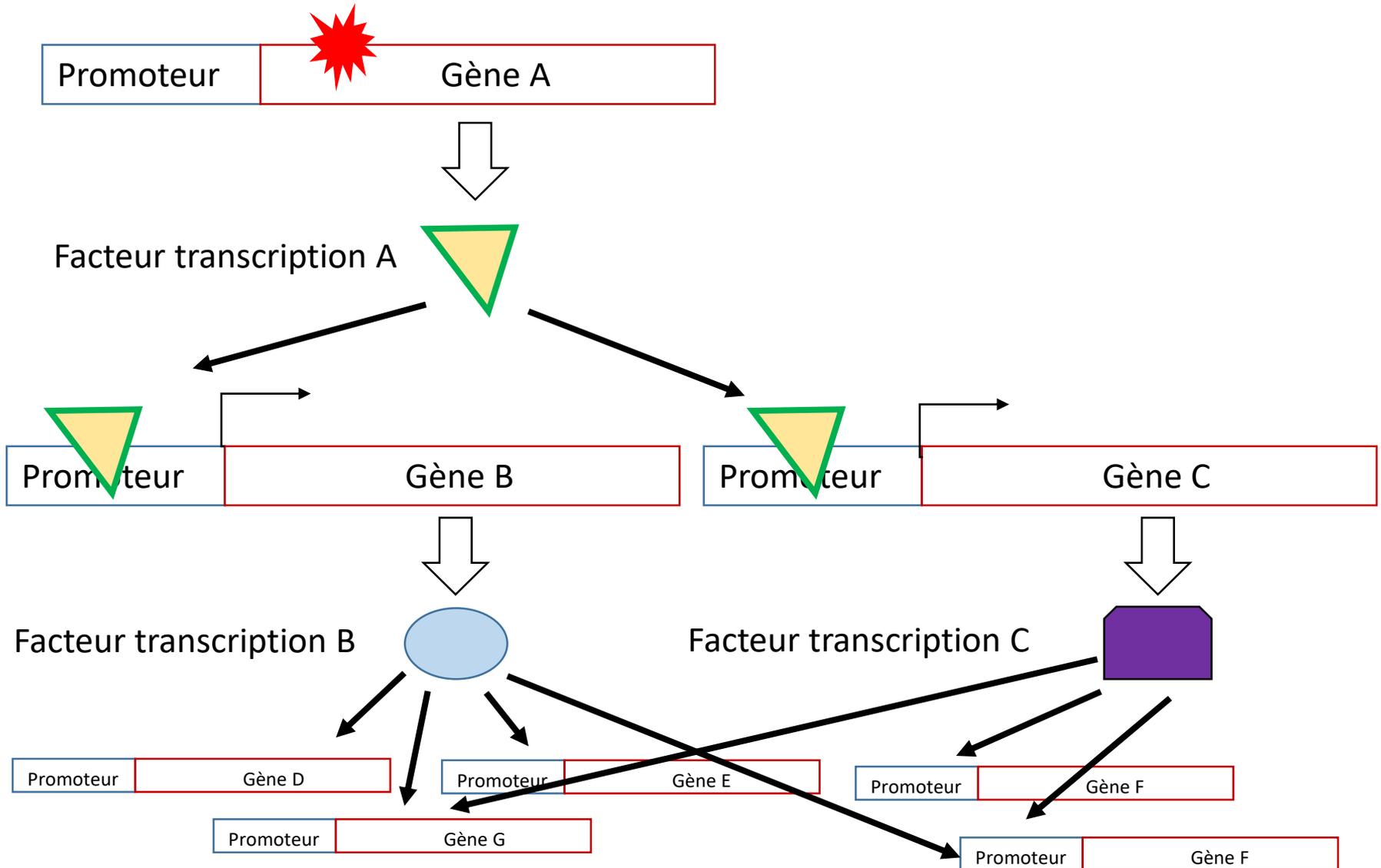
Les différents types de mutations



Mutation à effets multiples



Mutation à effets multiples



Quelque définitions

Mutation gain de fonction : ?

Mutation perte de fonction : ?

Mutation Kunck Out (K.O) : ?

Mutation Kunck In (K.I) : ?

Mutation Kunck Down : ?

Allèle : ?

Locus : ?

Annotation d'un allèle sauvage (Wild type : WT) chez les eucaryote: ?

Annotation d'un allèle mutant chez les eucaryote : ?

Annotation d'une protéine : ?

Annotation d'un allèle sauvage (Wild type : WT) chez les procaryote: ?

Annotation d'un allèle mutant chez les procaryotes : ?

Quelque définition

Mutation gain de fonction : généralement dominante

Mutation perte de fonction : généralement récessive.

Mutation Kunck Out (K.O) : mutation perte de fonction,

Mutation Kunck In (K.I) : mutation gain de fonction.

Mutation Kunck Down : réduction de la fonction du gène.

Allèle : les différentes formes d'un gène (Exe : WT ou mutant)

Locus : position physique d'un allèle dans le génome.

Annotation d'un allèle sauvage (Wild type : WT) chez les eucaryote:

Majuscule et *Italique*.

Annotation d'un allèle mutant chez les eucaryote : minuscule et *italique*

Annotation d'une protéine : majuscule.

Annotation d'un allèle sauvage (Wild type : WT) chez les procaryote:

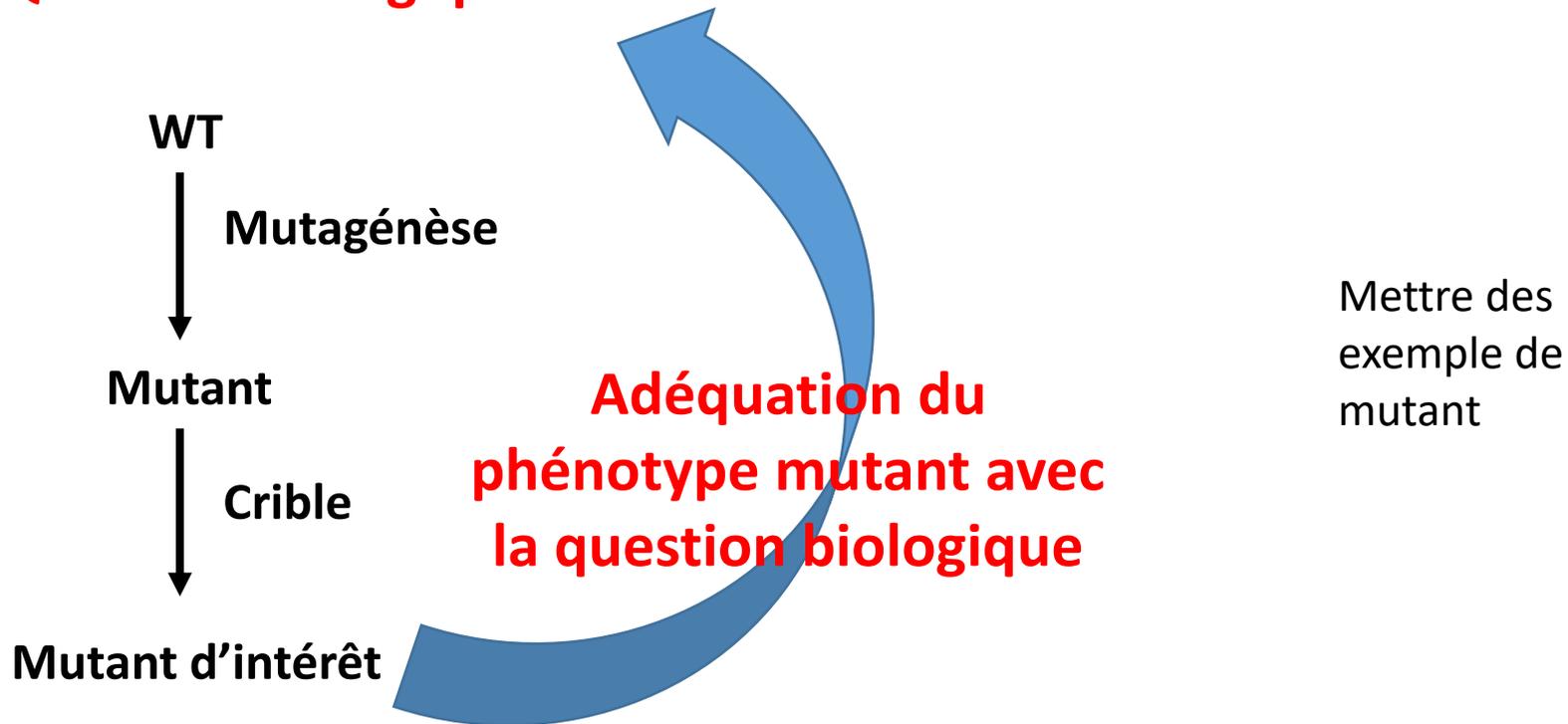
Première lettre Majuscule et *Italique*.

Annotation d'un allèle mutant chez les procaryotes : première lettre

minuscule et *italique*

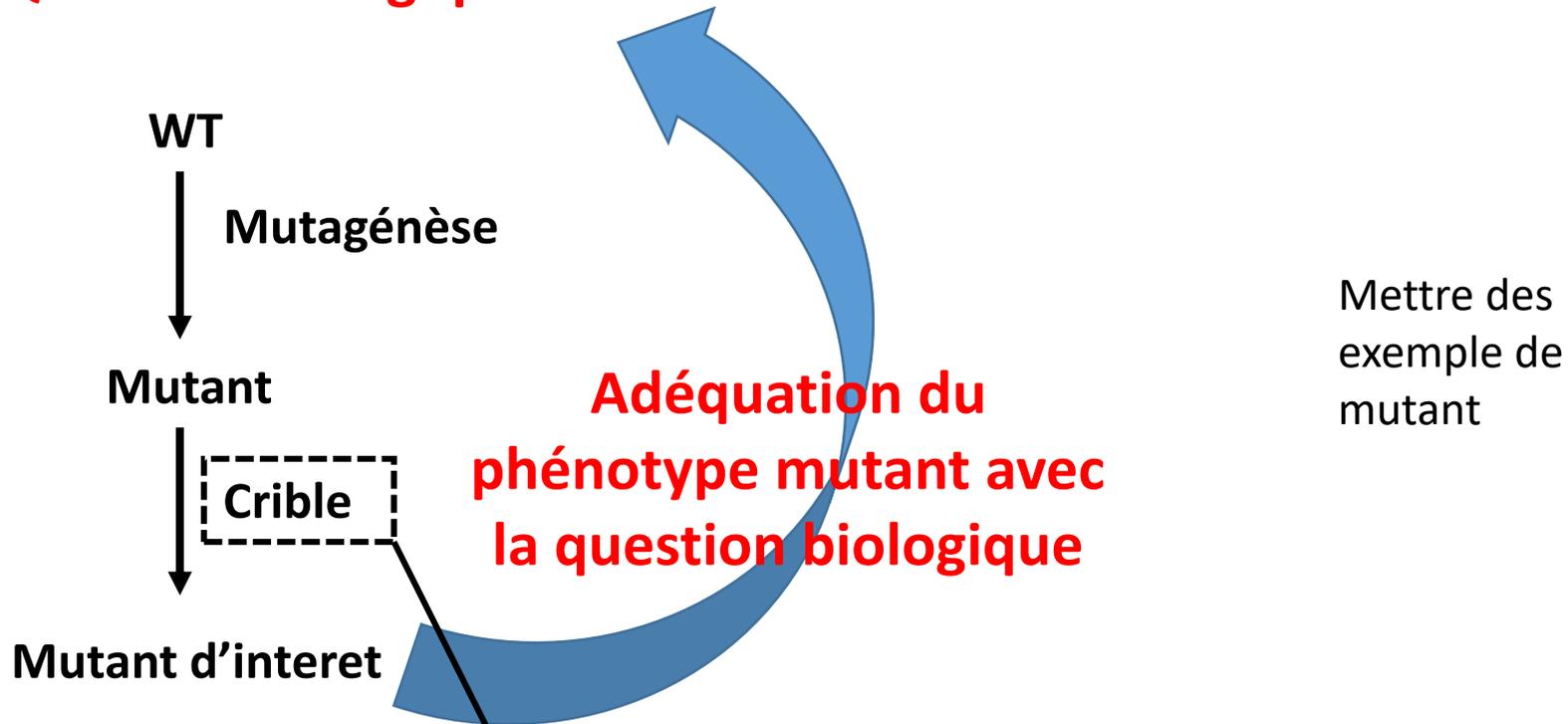
Le crible phénotypique étape clé

Question biologique



Le crible phénotypique étape clé

Question biologique



Mutant d'interet

**Adéquation du
phénotype mutant avec
la question biologique**

Mettre des
exemple de
mutant

* Crible phénotypique : sélectionner les mutants ayant un phénotype externe intéressant.

* Crible moléculaire : les mutants non pas de phénotype externe, on étudie le comportement de gènes cibles connues pour contrôler le processus étudié

Les phénotypes attendue pour notre étude

Comment designer notre crible ?

Quelle phénotype attendue pour les plantes mutantes et pour les bactéries mutantes ?

Quelle étapes après l'identification des mutants d'interêt ?

Identification des gènes mutées

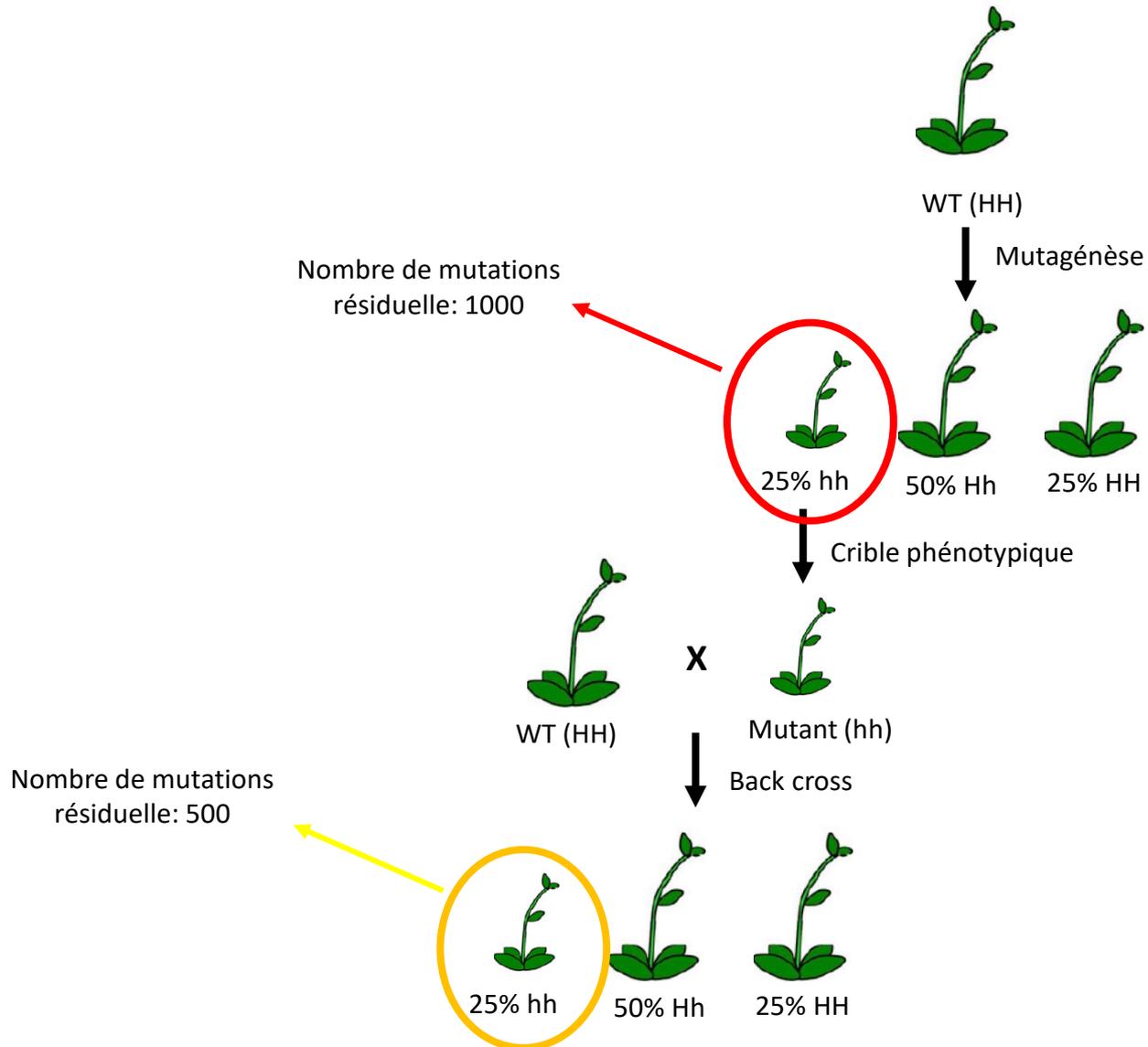
En fonction du type d'agent mutagène utilisé, de la connaissance du génomes ainsi que du budget alloué à l'étude, la stratégie d'identification du/des gènes muté est différentes.

	Mutation ponctuelle EMS	Mutation suite à une insertion
Allèle sauvage (H)	xxxAGTAGTCTGATGCTGATCCCTGAxxxx	xxxAGTAGTCTGATGCTGATCCCTGAxxxx
Allèle mutant (h)	xxxAGTAGGCTGATGCTGATCCCTGAxxxx	xxxAGTAGTCTGATATATATATTTGGCCCCATGCTGATCCCTGAxxxx

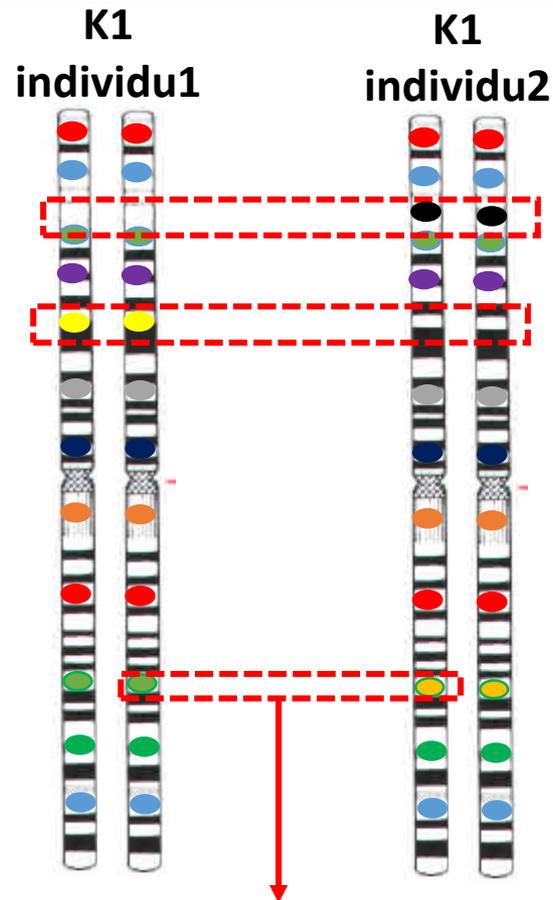
Au cours de la mutagenèse plusieurs milliers de mutations en lieu, certaines ont des effets d'autre non.

Il y a la nécessité de purifier le fond génétique mutant pour faciliter l'identification de la mutation d'interet.

La purification du fond génétique



Les marqueurs moléculaires et la cartographie des génomes



K1
individu1

K1
individu2

ATTAGTACCGTACTT

ATTACAACCCTTACTT

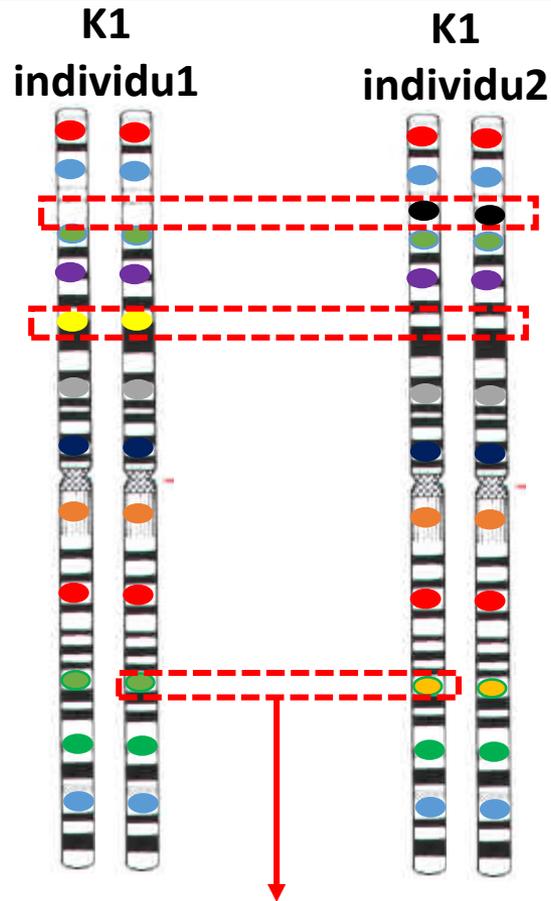
* Les marqueurs moléculaires sont des séquences d'ADN présentes dans le génome et soumises à des variations permettant de générer du polymorphisme de séquence.

* Le terme de marqueurs est synonyme de « locus marqueur ; qui signe une position unique sur le génome ».

* La variation des marqueurs (polymorphisme) a lieu entre deux individus d'espèce éloignées, proches et même entre deux individus d'une même espèce.

* L'identification précise de leur localisation sur les génomes, nous permet de les utiliser en tant que balise de reconnaissance pour situer notre mutation d'intérêt dans le génome.

Les marqueurs moléculaires et la cartographie des génomes



K1
individu1

K1
individu2

ATTAGTACCGTACTT

ATTACAACCCTTACTT

- La comparaison des marqueurs repose sur différents principes :
 - La mesure de la longueur des fragments d'ADN.
 - La détection de l'absence ou la présence de sites de restrictions.
 - L'hybridation ou non entre deux brins d'ADN.
 - La détection des différences de conformation de l'ADN.

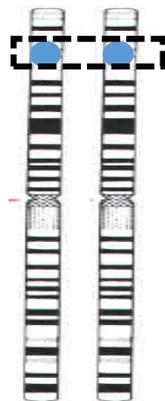
Les marqueurs moléculaires sont sollicités pour la cartographie des génomes et les techniques associées seront détaillées dans le chapitre 8.

Exemple d'utilisation de marqueur pour identifier une mutation ponctuelle

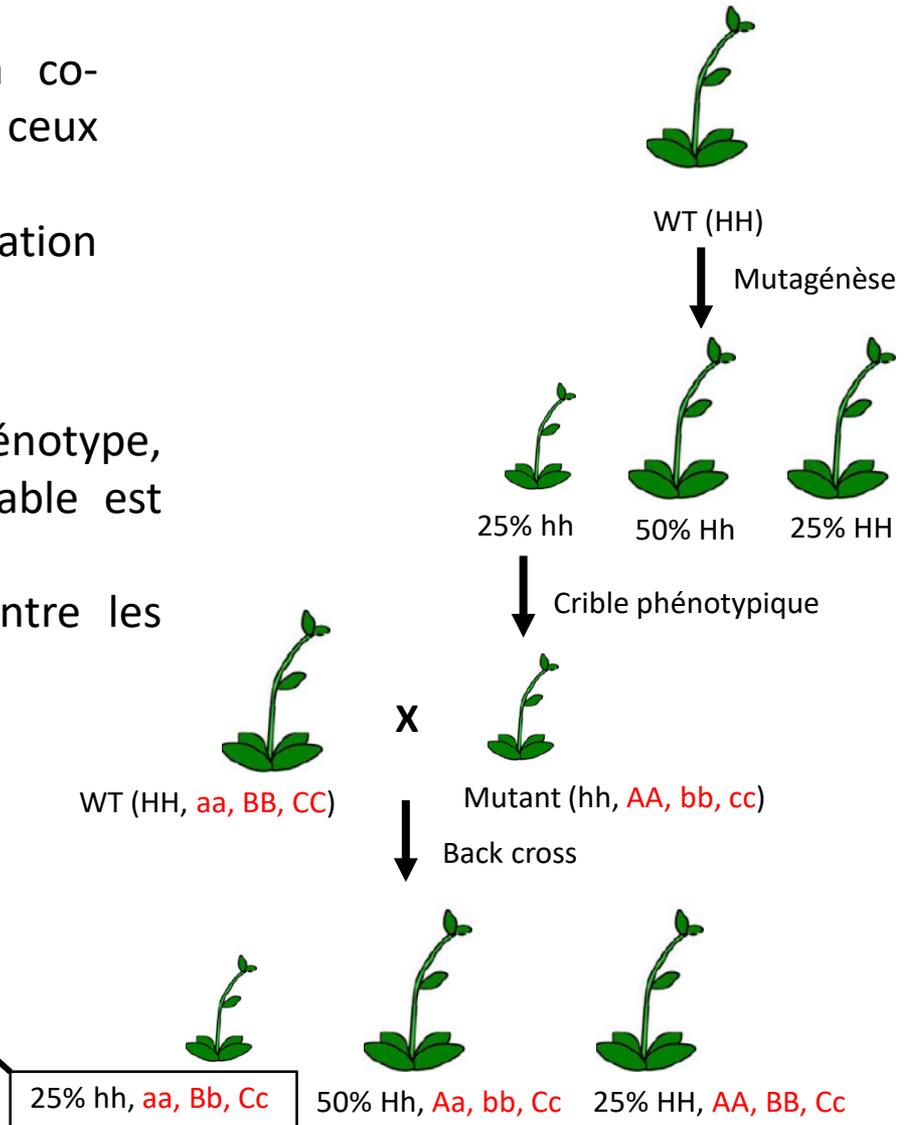
Au cours des back cross on étudie la co-ségrégation des marqueurs afin d'identifier ceux qui co-ségrègent avec le phénotype
Grace à cela nous pouvons situer la mutation dans le génome

Le marqueur (a) Co ségrége avec le phénotype, cela indique que la mutation responsable est proche de (a).

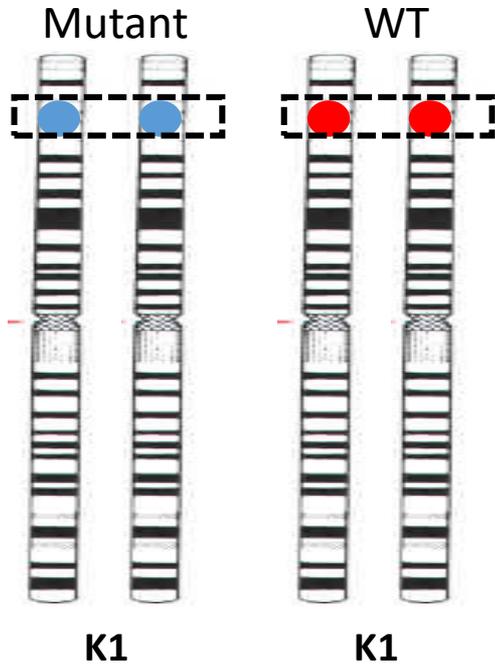
(a) Est situé sur le chromosome 1 entre les nucléotide 1120 et 1200



K1



Amplification des régions associées à la mutation



K1 mutant

ATGTCTATGACGTATTAGATTTCGGCATACTTTGCTGC

K1 WT

ATGTCTATGCCGTATTACATATGTCCTACTTTGACGC

Extraction ADNg

Chapitre 8

Amplification PCR

Clonage

Chapitre 3 & TD

Séquençage

Chapitre 5

Analyse *in silico*

Chapitre 6 & TP

Mutation
d'intérêt

K1 Mutant
K1 WT

ATGTCTATGACGTATTAGATTTCGGCATACTTTGCTGC
ATGTCTATGCCGTATTACATATGTCATTACTTTGACGC

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Primer left/forward

Amorce directe

TAAACGGACTATACAGATA

ATTTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT
TAAACGGACTATACAGATACTGCATAAT**CTAAAGCCGT**ATGAAACGACGCAGCTAGCTAAA

TTGCTGCGTCGATCGATT

Primer right/revers

Amorce revers

Polymerase Chain Reaction (PCR)

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT
TAAACGGACTATACAGATACTGCATAATCTAAAGCCGTATGAAACGACGCAGCTAGCTAAA

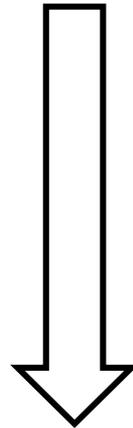
dNTP (d**ATP**, d**CTP**, d**TTP**, d**GTP**)

Tompon

MgCl₂⁺

Amroces (D & F)

Taq Polymerase



Dénaturation de l'ADN a 94°C

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT

TAAACGGACTATACAGATACTGCATAATCTAAAGCCGTATGAAACGACGCAGCTAGCTAAA

Polymerase Chain Reaction (PCR)

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT
TAAACGGACTATACAGATACTGCATAATCTAAAGCCGTATGAAACGACGCAGCTAGCTAAA

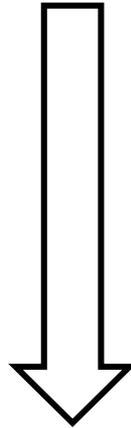
dNTP (**dATP**, **dCTP**, **dTTP**, dGTP)

Tompon

MgCl₂⁺

Amroces (D & F)

Taq Polymerase



Hybridation de l'amorce 56°C à 64°C
(Température dépend du T_m et de la
longueur des amorces)

TAAACGGACTATACAGATA

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT

Polymerase Chain Reaction (PCR)

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT
TAAACGGACTATACAGATACTGCATAATCTAAAGCCGTATGAAACGACGCAGCTAGCTAAA

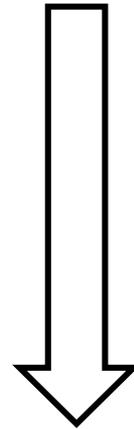
dNTP (**dATP**, **dCTP**, **dTTP**, dGTP)

Tompon

MgCl₂⁺

Amroces (D & F)

Taq Polymerase



Fixation de la taq polymerase (ADN polymerase thermorésistante) sur l'amorce pour les deux brins (un seul brin représenté)



Taq Polumerase

TAAACGGACTATACAGATA

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT

Polymerase Chain Reaction (PCR)

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT
 TAAACGGACTATACAGATACTGCATAATCTAAAGCCGTATGAAACGACGCAGCTAGCTAAA

dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

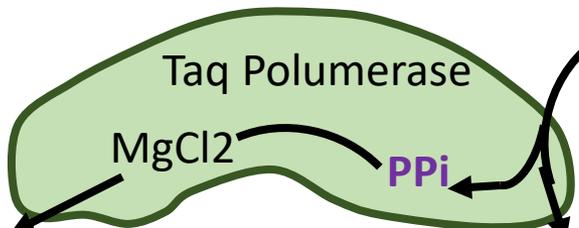
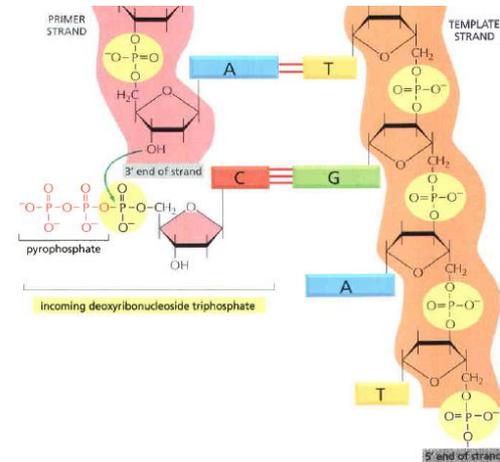
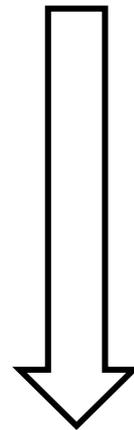
Tompon

MgCl₂⁺

Amroces (D & F)

Taq Polymerase

Amplification de la matrice par la Taq à 72°C



PPi TAAACGGACTATACAGATAT
 ATTTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT

Polymerase Chain Reaction (PCR)

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**A TACTTTGCTGCGTCGATCGATTT
TAAACGGACTATACAGATACTGCATAATCTAAAGCCGTATGAAACGACGCAGCTAGCTAAA

dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

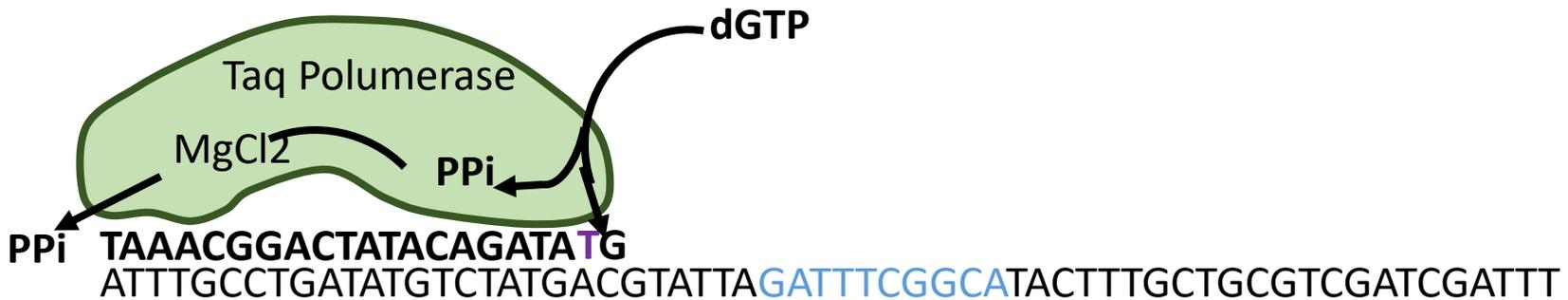
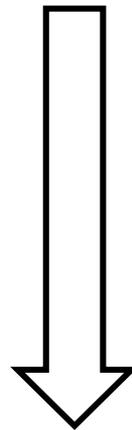
Tompon

MgCl₂⁺

Amroces (D & F)

Taq Polymerase

Amplification de la matrice par la Taq à
72°C



Polymerase Chain Reaction (PCR)

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**A TACTTTGCTGCGTCGATCGATTT
TAAACGGACTATACAGATACTGCATAATCTAAAGCCGTATGAAACGACGCAGCTAGCTAAA

dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

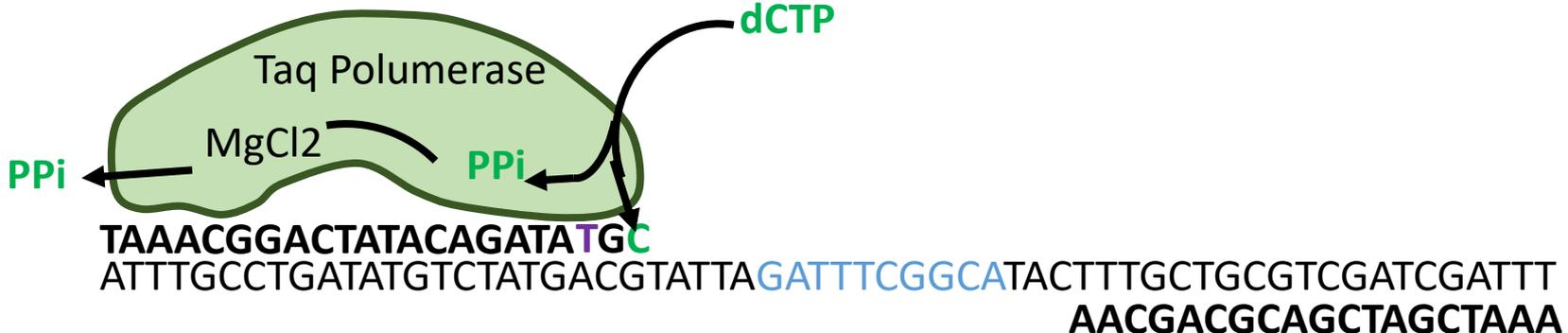
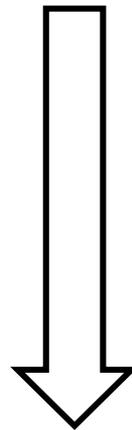
Tompon

MgCl₂⁺

Amroces (D & F)

Taq Polymerase

Amplification de la matrice par la Taq à
72°C



Polymerase Chain Reaction (PCR)

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT
TAAACGGACTATACAGATACTGCATAATCTAAAGCCGTATGAAACGACGCAGCTAGCTAAA

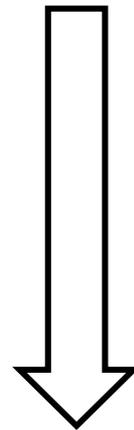
dNTP (**dATP**, **dCTP**, **dTTP**, **dGTP**)

Tompon

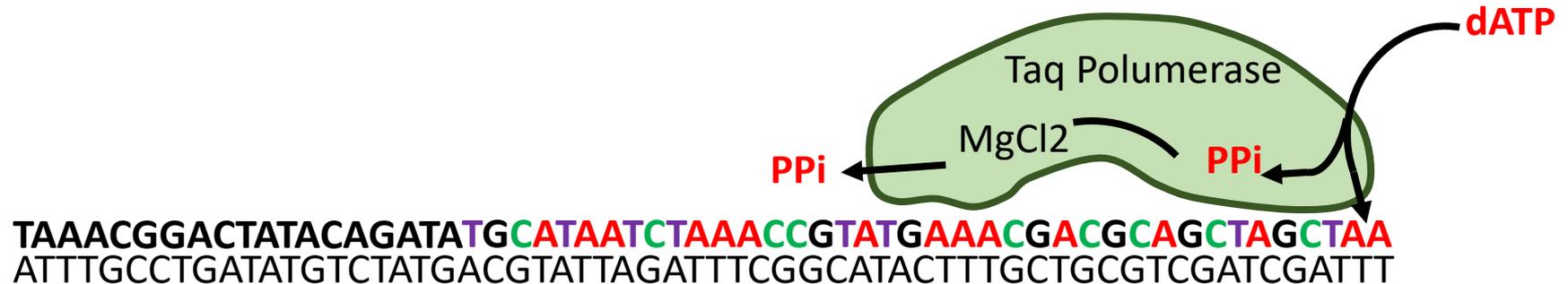
MgCl₂⁺

Amroces (D & F)

Taq Polymerase



Amplification de la matrice par la Taq à 72°C



Polymerase Chain Reaction (PCR)

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTA**GATTCGGC**ATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT
TAAACGGACTATACAGATACTGCATAATCTAAAGCCGTATGAAACGACGCAGCTAGCTAAA

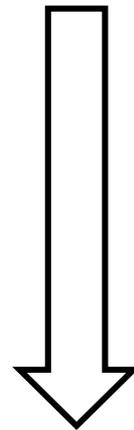
dNTP (**dATP**, **dCTP**, **dTTP**, **dGTP**)

Tompon

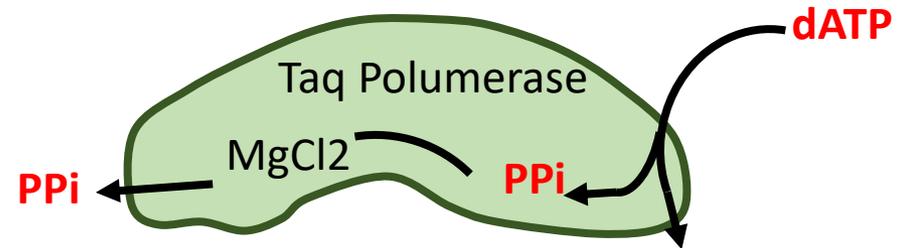
MgCl₂⁺

Amroces (D & F)

Taq Polymerase



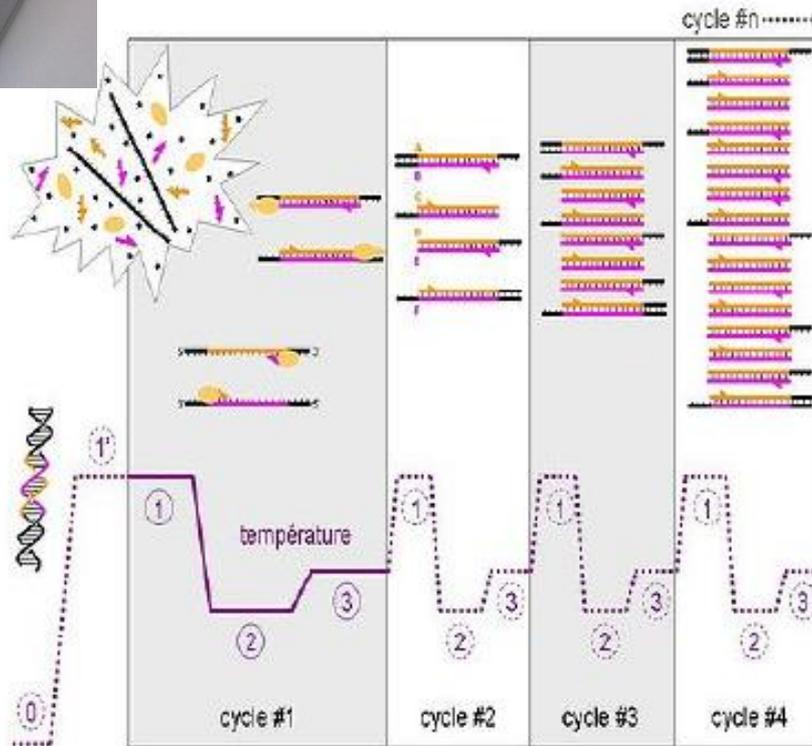
Néo synthèse du fragment d'ADN,
séparation à 94°C



TAAACGGACTATACAGATAT**GCATAATCTAAACCGTATGAAACGACGCAGCTAGCTAA**

ATTGCCTGATATGTCTATGACGTATTAGATTCGGCATACTTTGCTGCGTCGATCGATTT

Polymerase Chain Reaction (PCR)



T° de dénaturation: 94°C à 5min puis 0.30 à 1 min au cours des cycles d'amplification.

T° hybridation des amorces: 56 à 64 °C pendant 0.30 min.

T° d'élongation: 72°C pour le temps vitesse POL/taille fragments à amplifié.

Les différentes Taq Polymerase disponible dans le marché

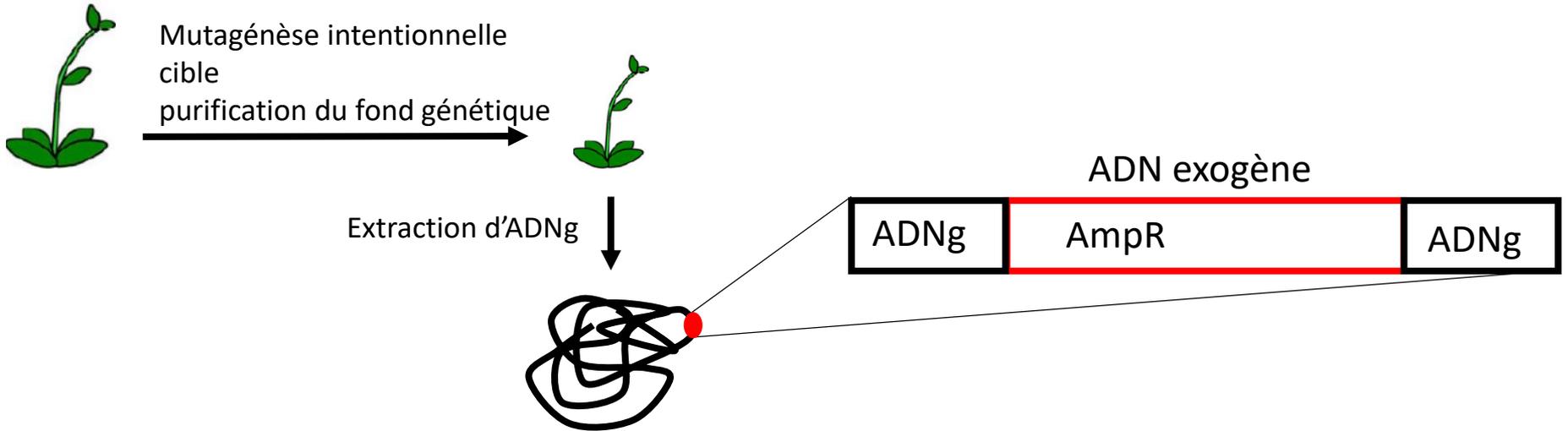
Identification des FST



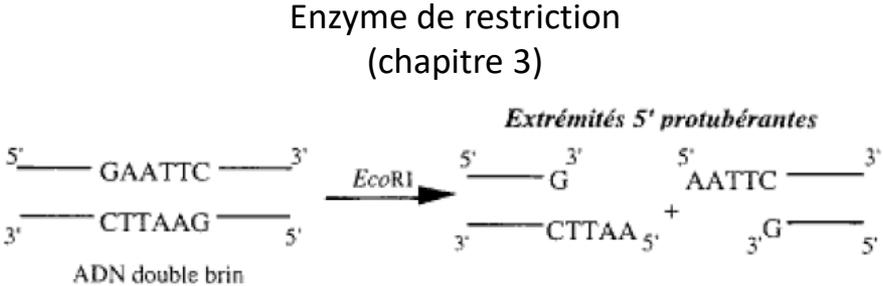
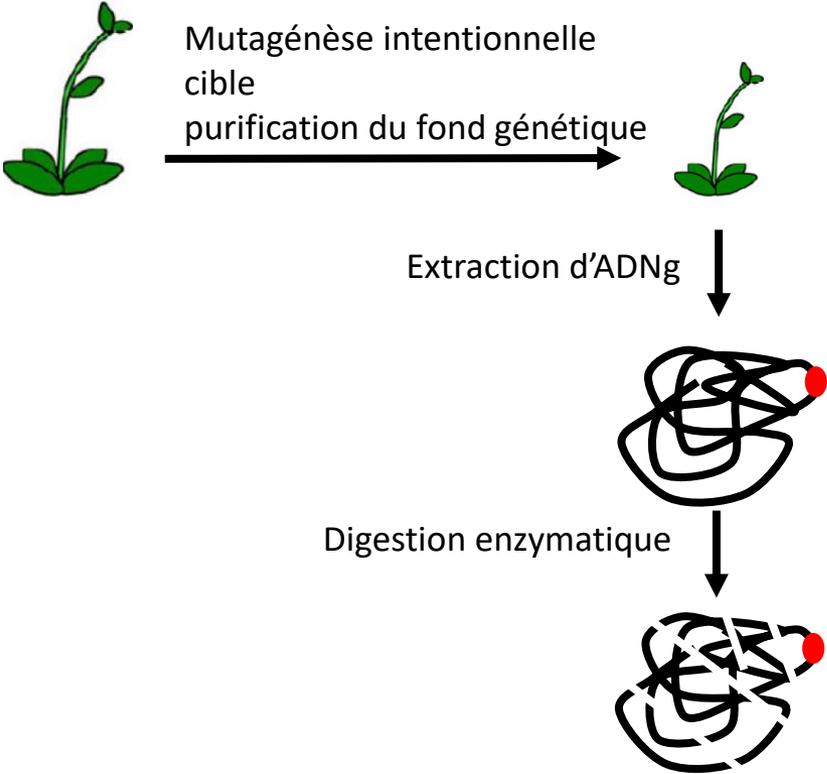
Mutagenèse intentionnelle
cible
purification du fond génétique



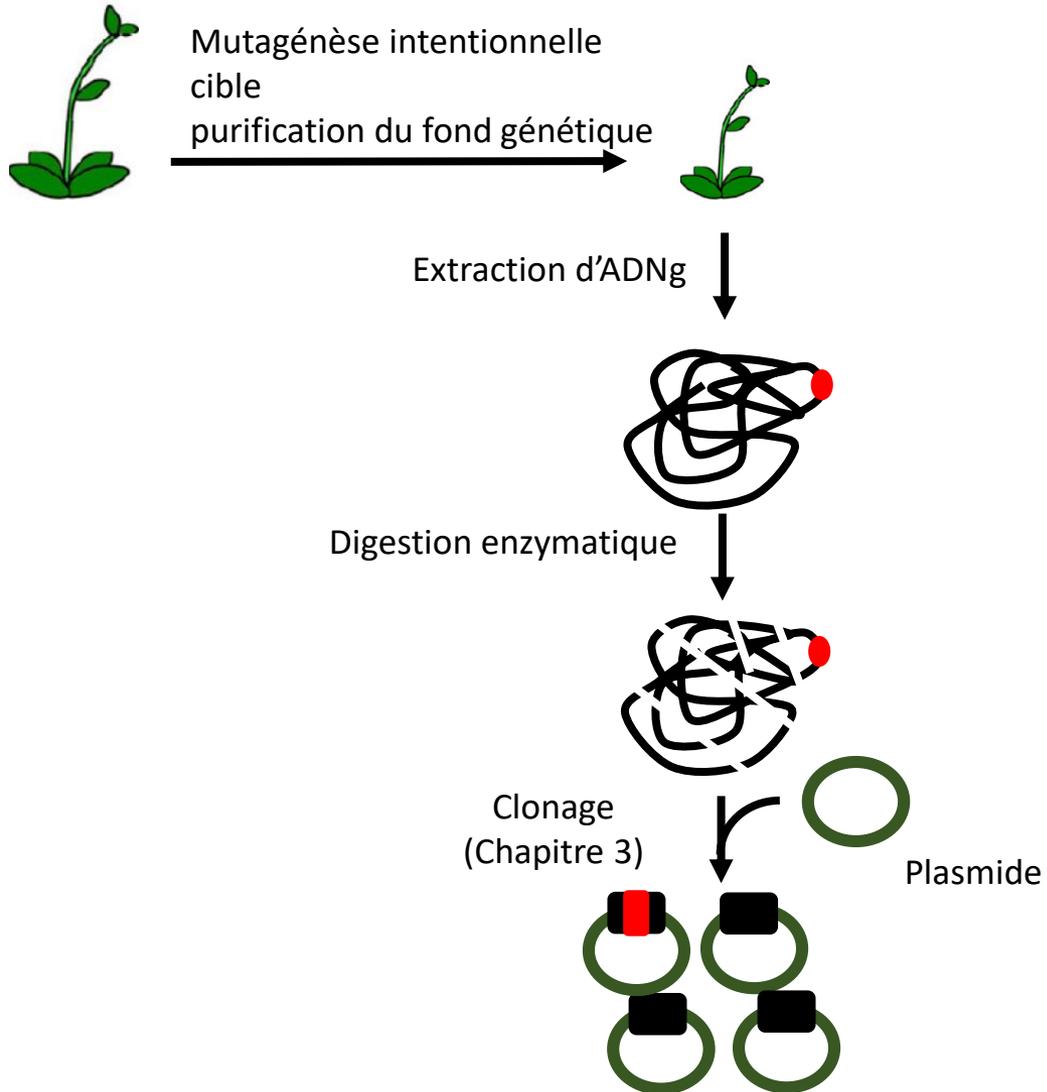
Identification des FST



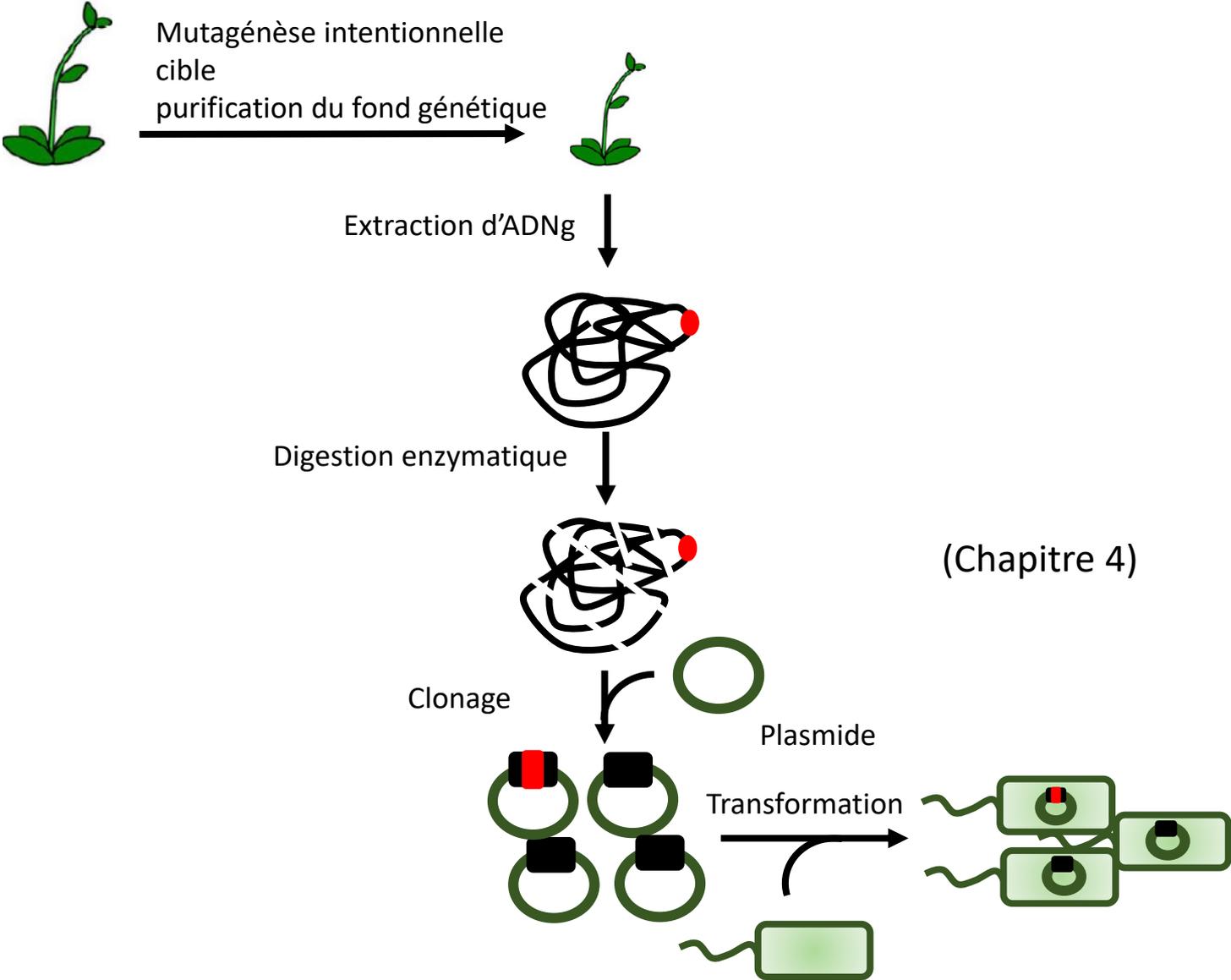
Identification des FST



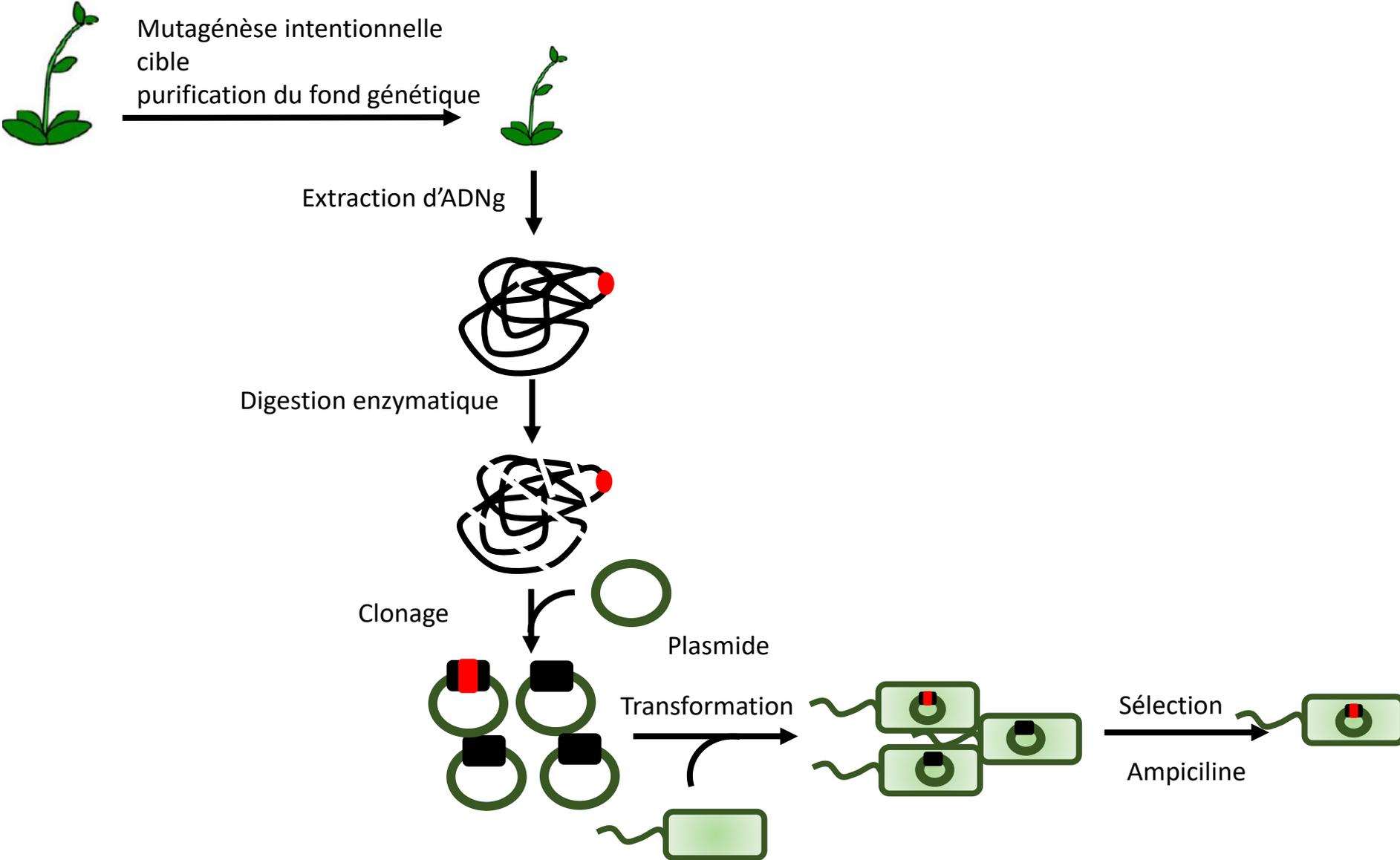
Identification des FST



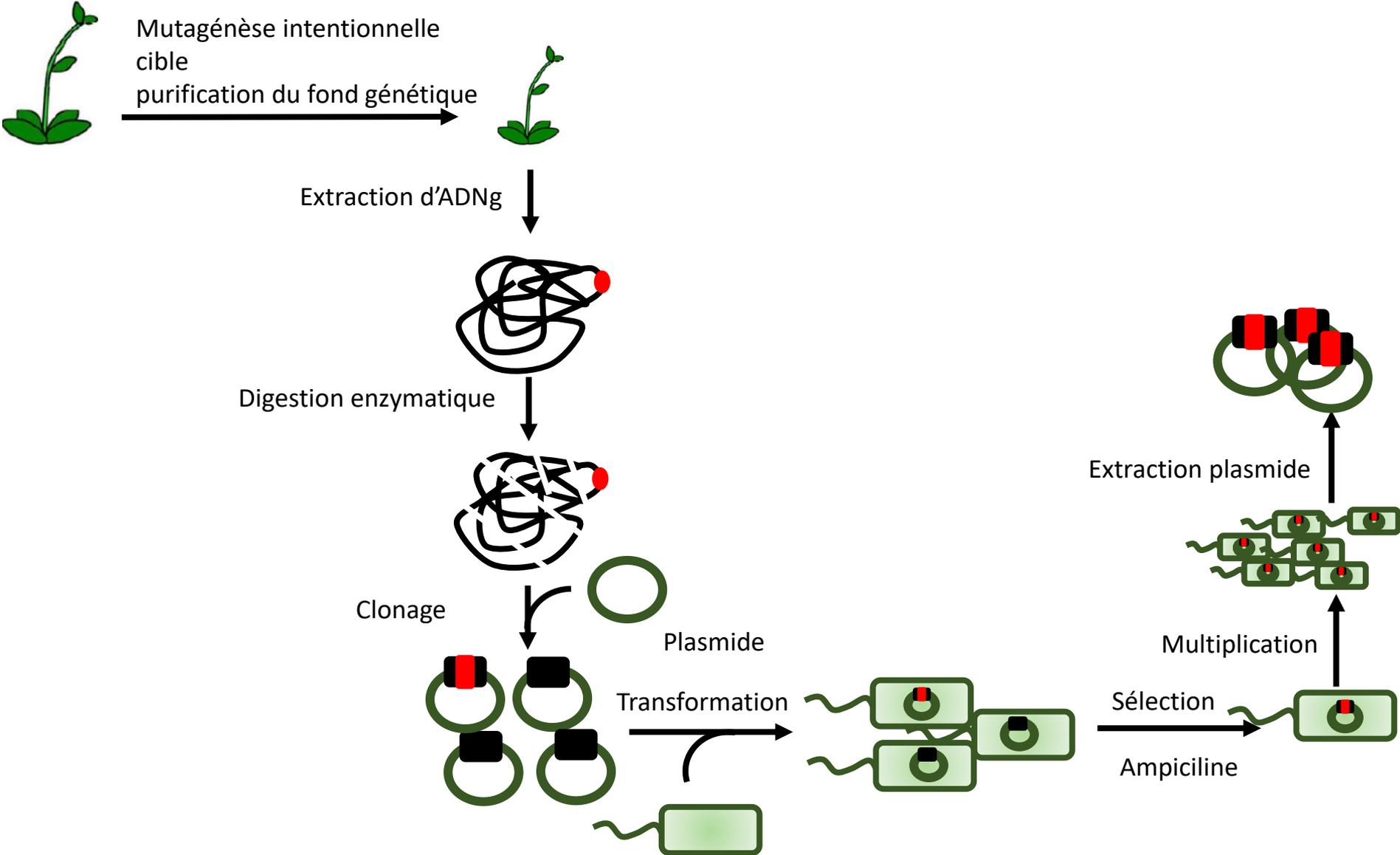
Identification des FST



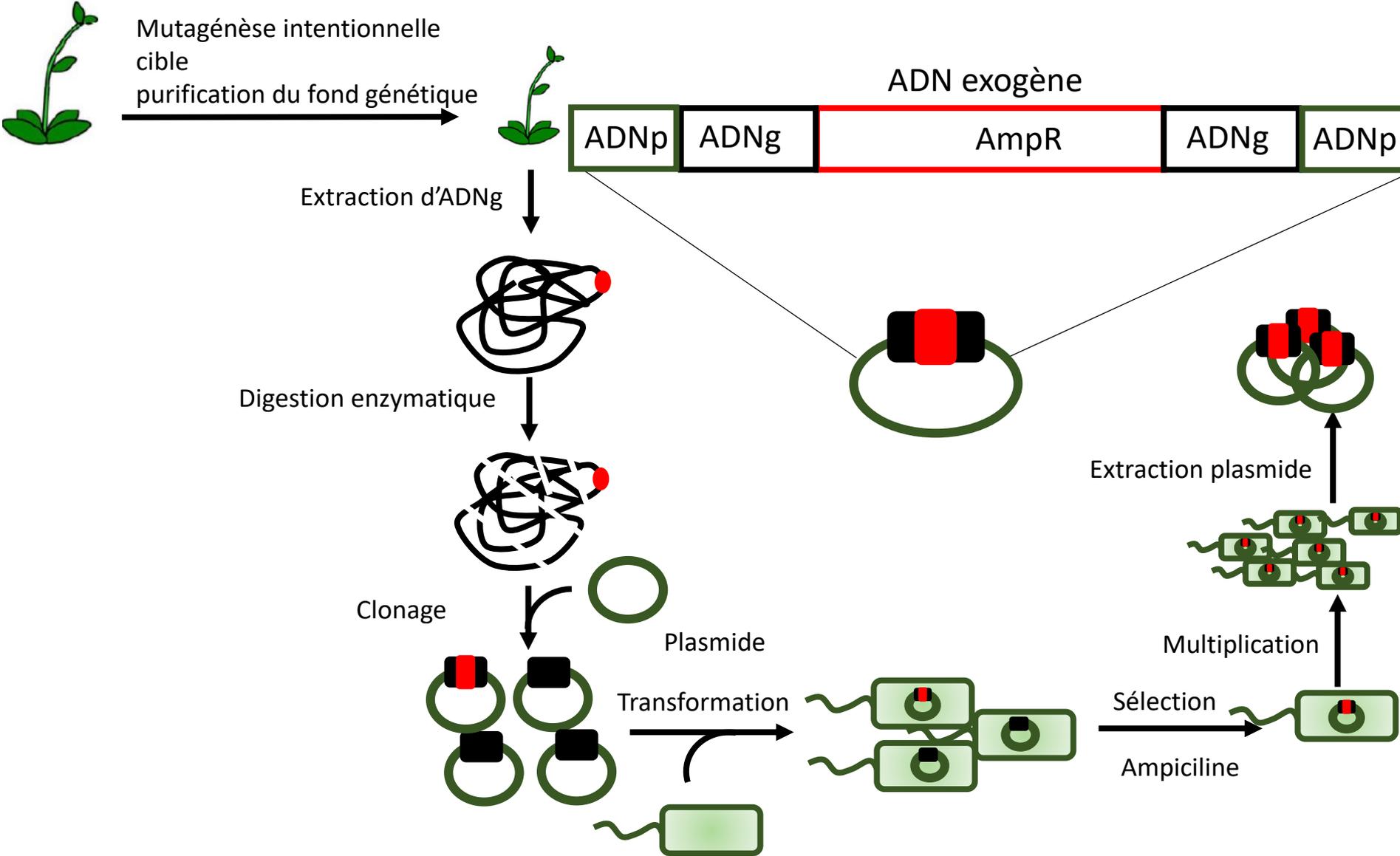
Identification des FST



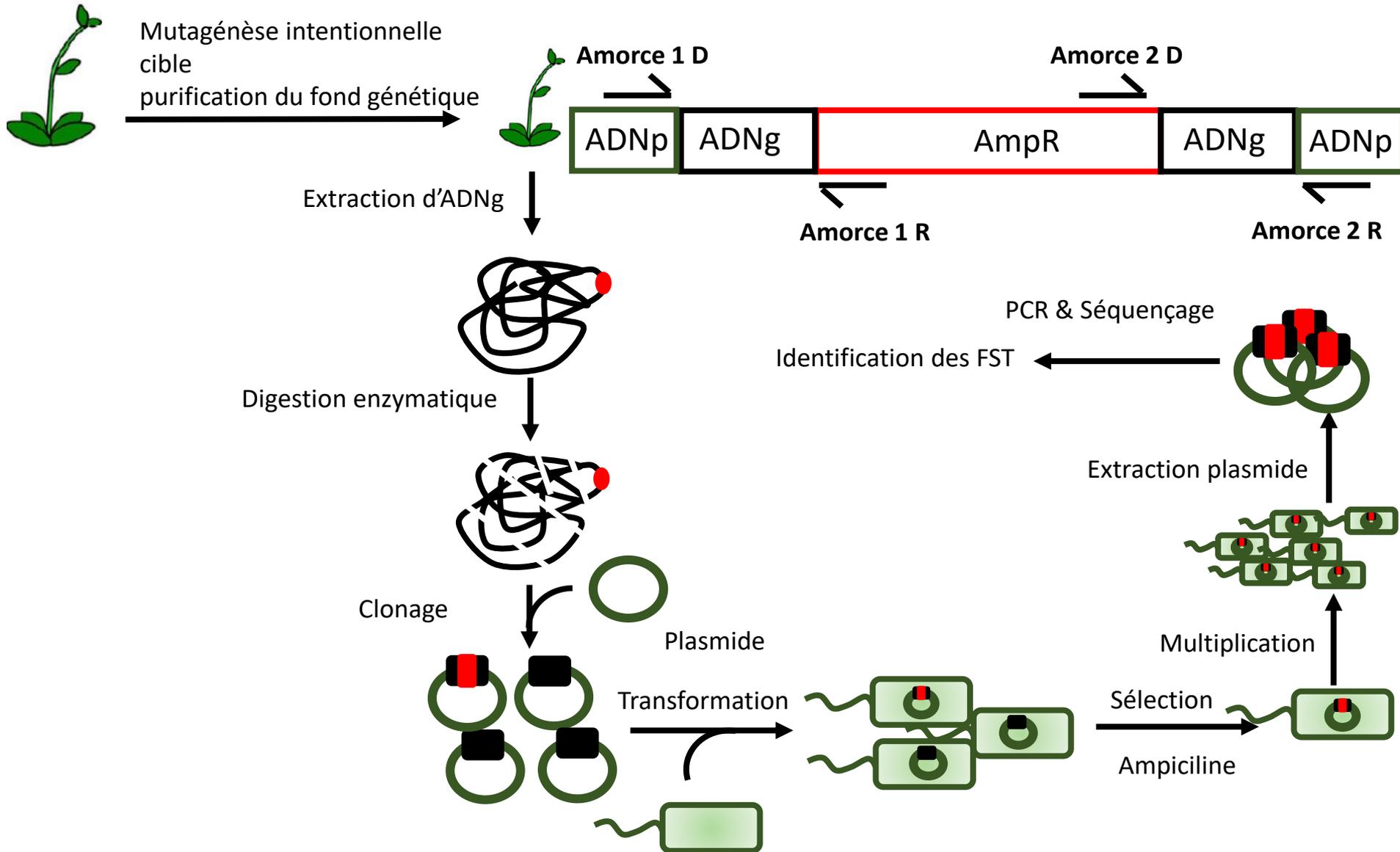
Identification des FST



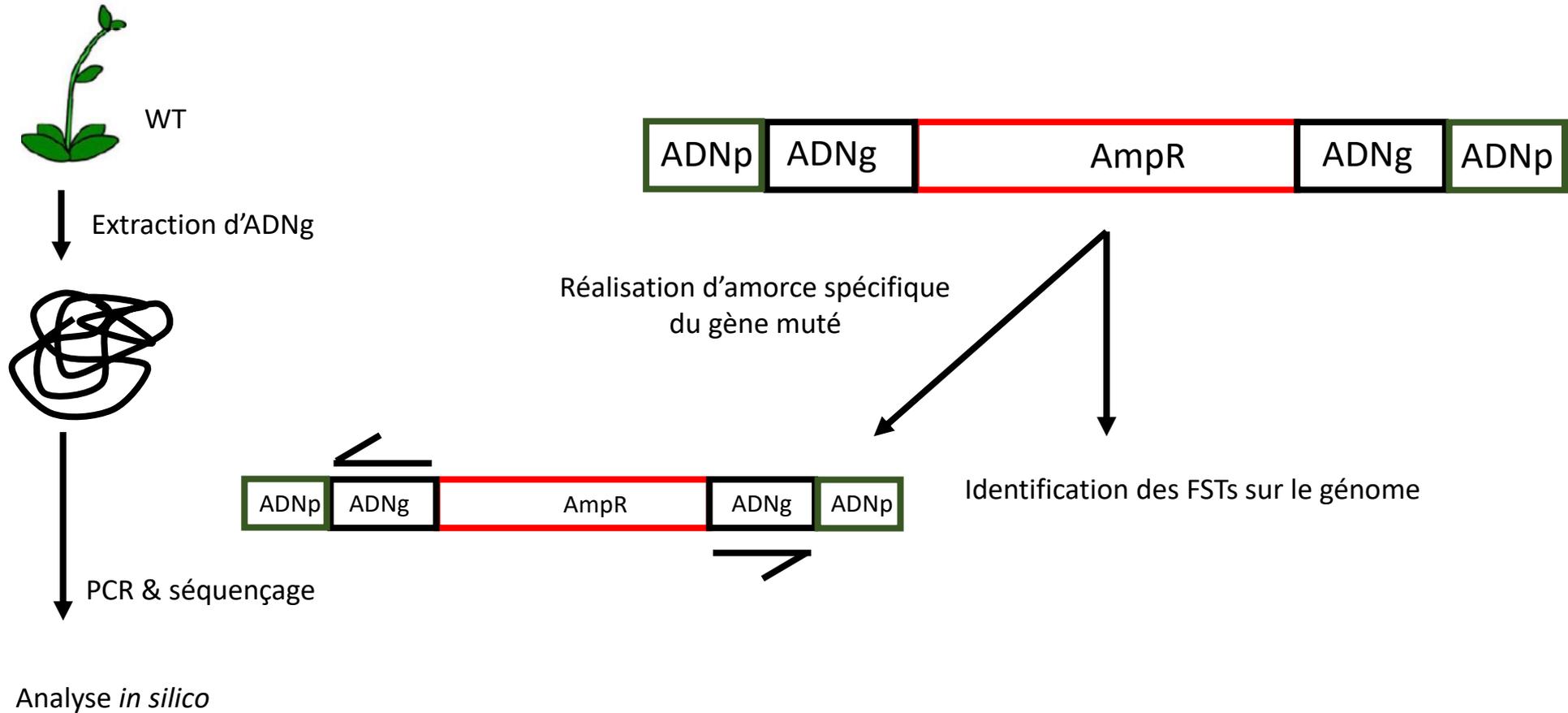
Identification des FST



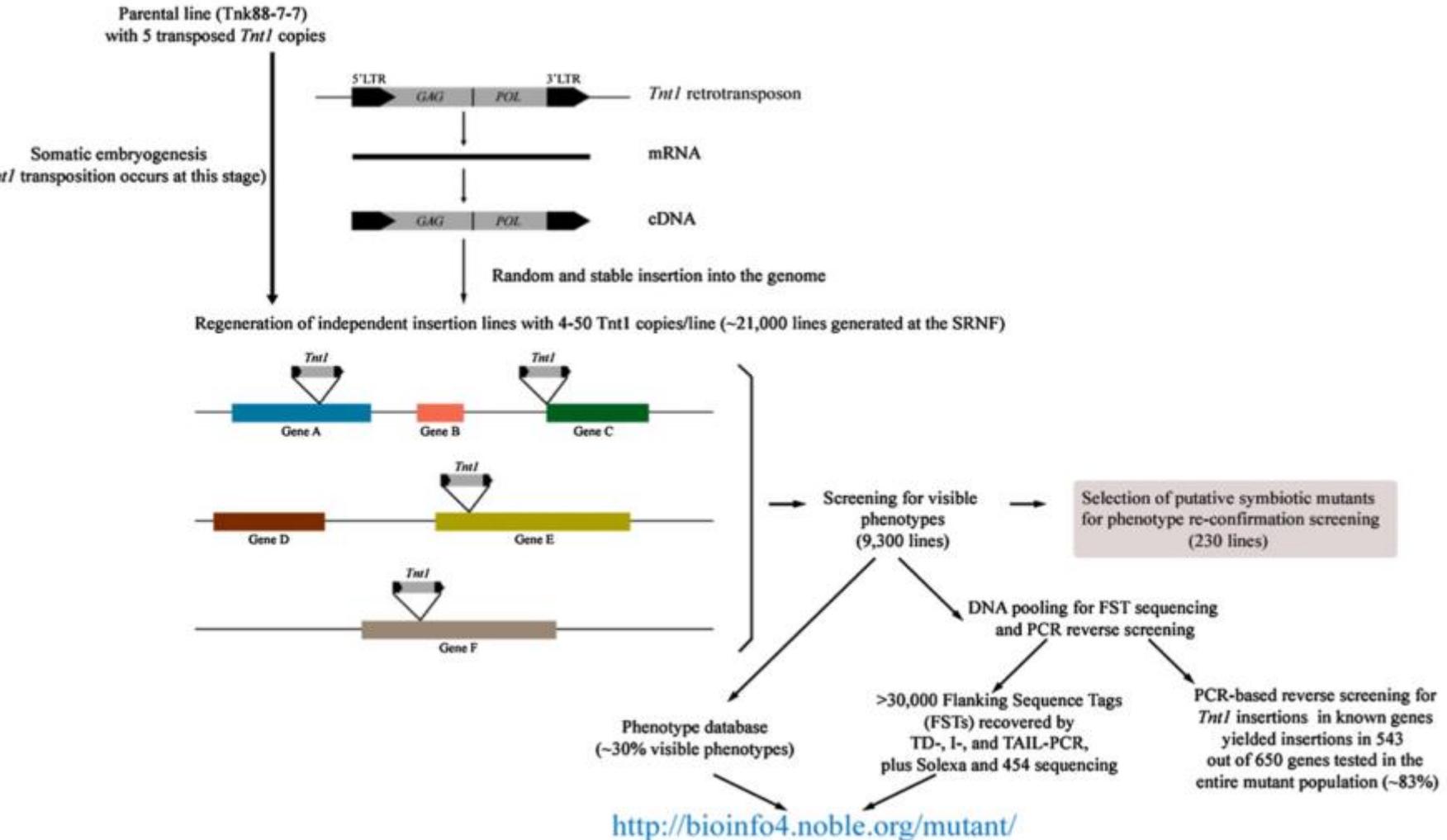
Identification des Flanking sequence Tag (FST)



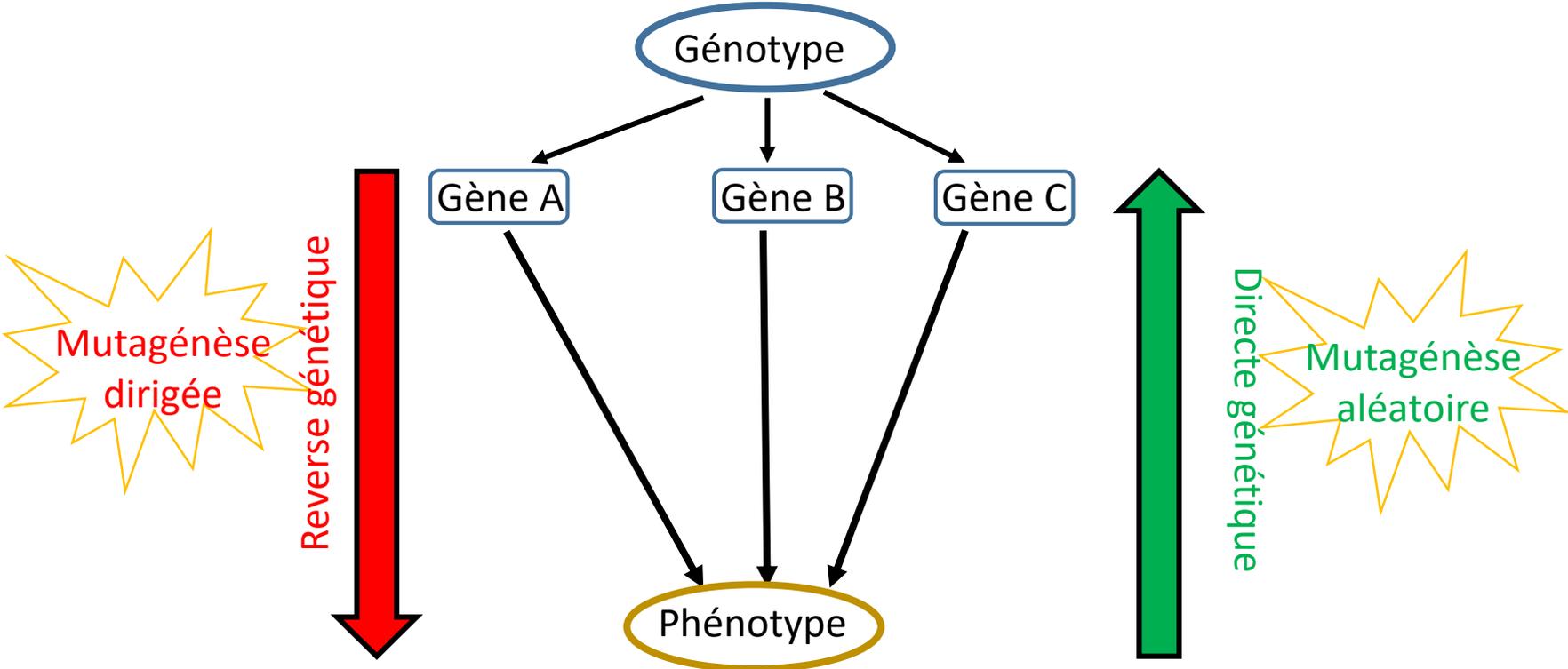
Identification des Flanking sequence Tag (FST)



Transposant *tnt1* chez *M. truncatula*



Stratégie de recherche



Générer des mutants

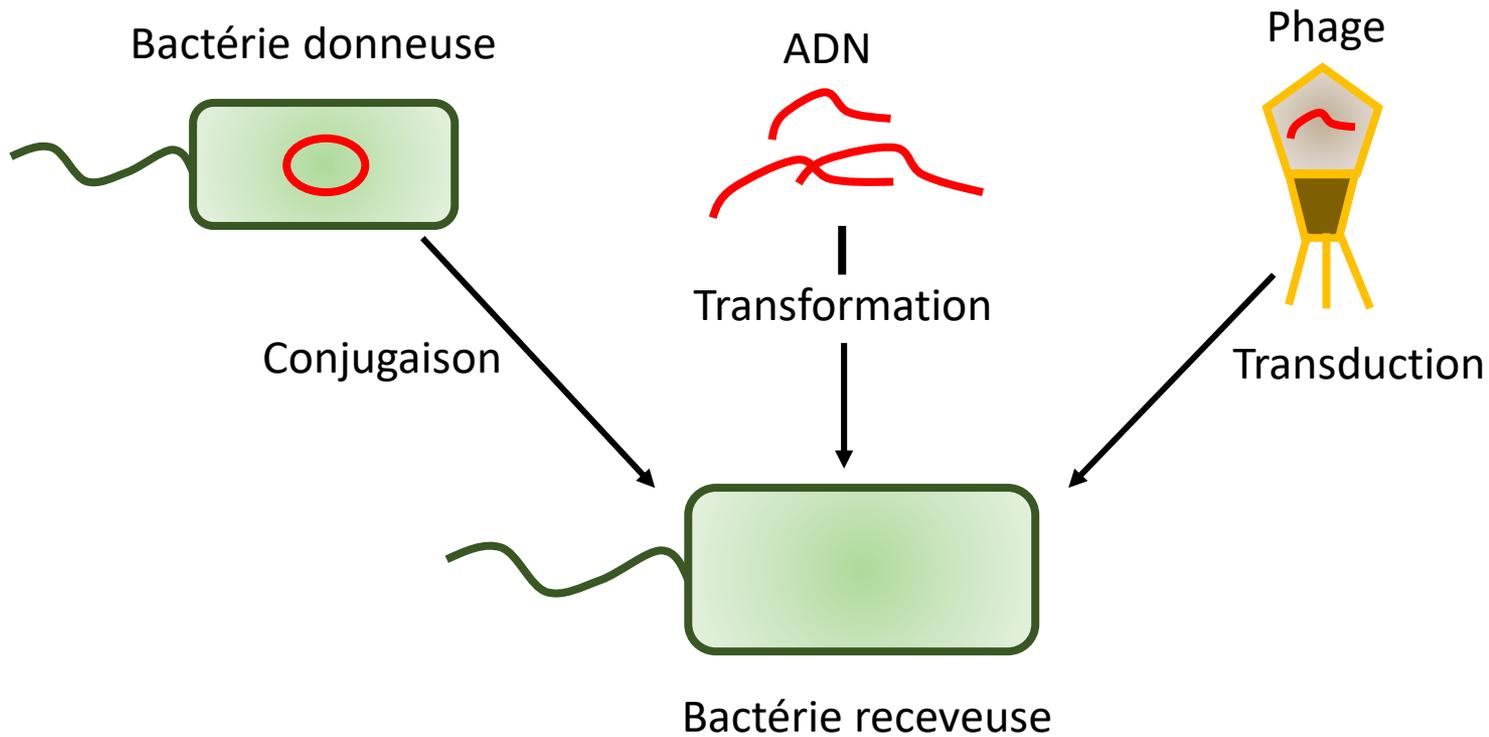
Mutagenèse Aléatoire (affecte de manière aléatoire les gènes)

- éthyle methanesulfonate (EMS)
- Mutagenèse rapide neutron
- Mutagenèse UV
- Mutagenèse par insertion
 - Insertion T-DNA
 - Insertion de transposant

Mutagenèse dirigée (touche de manière ciblée certains gènes)

- Système bactérien
- RNAi
- Ribozyme
- CRISPER-CAS9

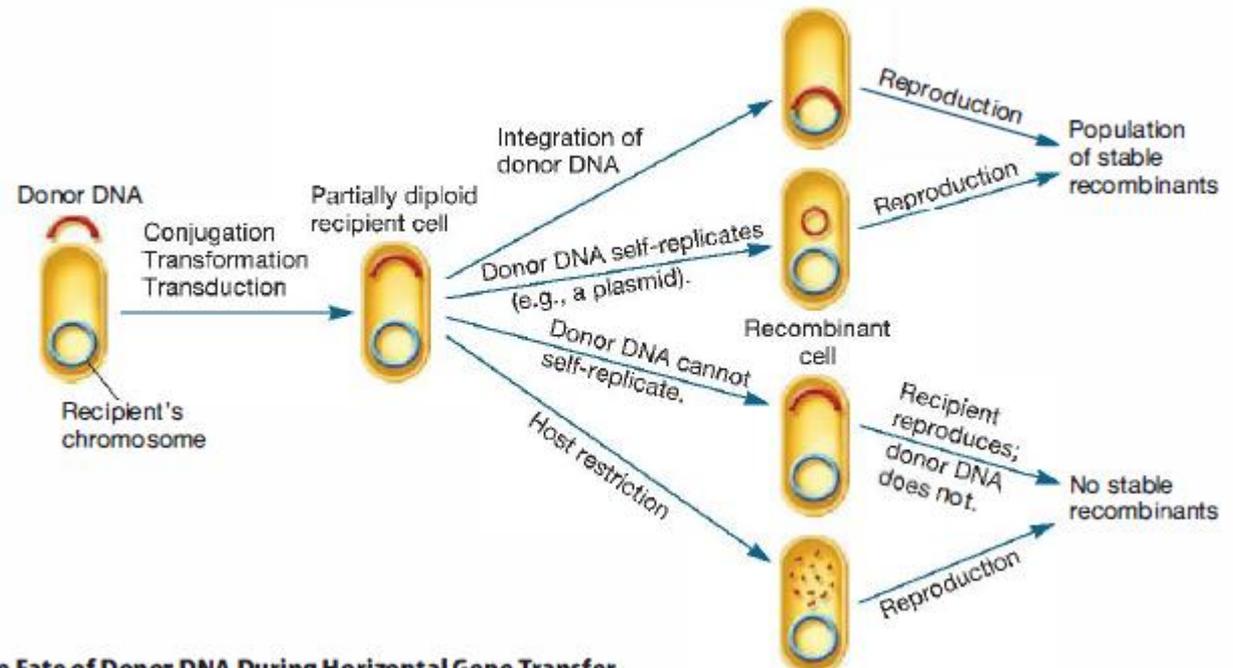
La transfert du matériels génétique chez les bactéries



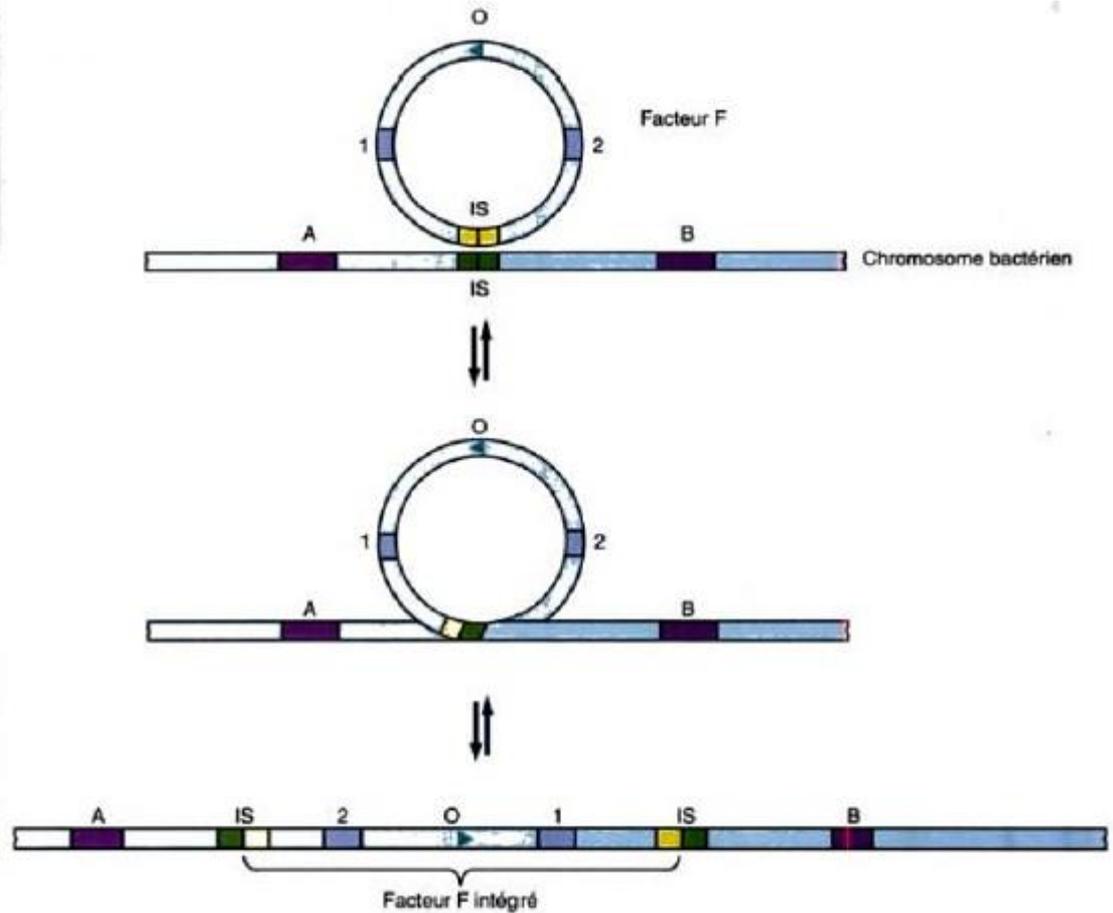
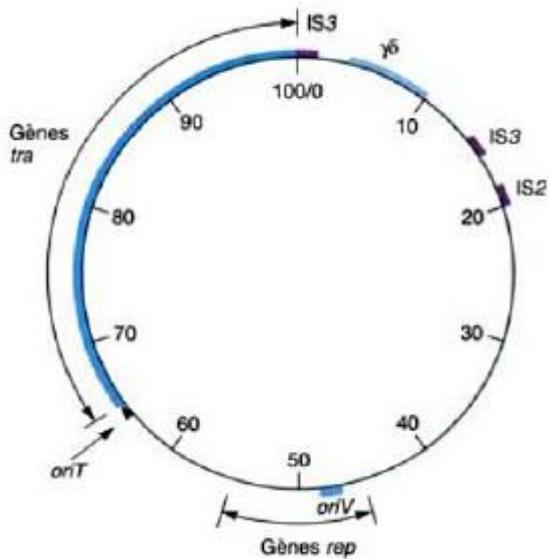
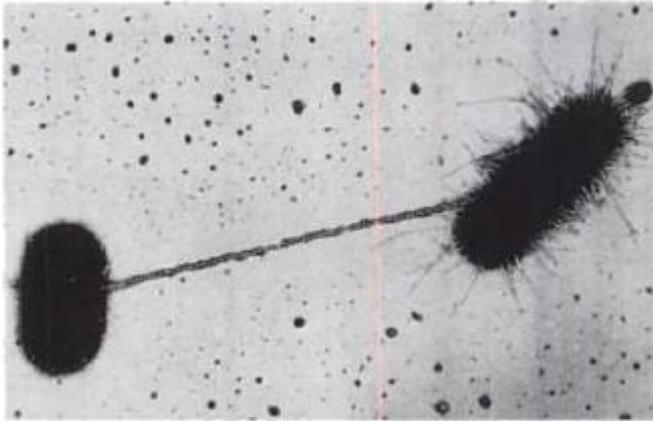
La transfert du matériels génétique chez les bactéries

Selon la nature du matériel génétique exogène :

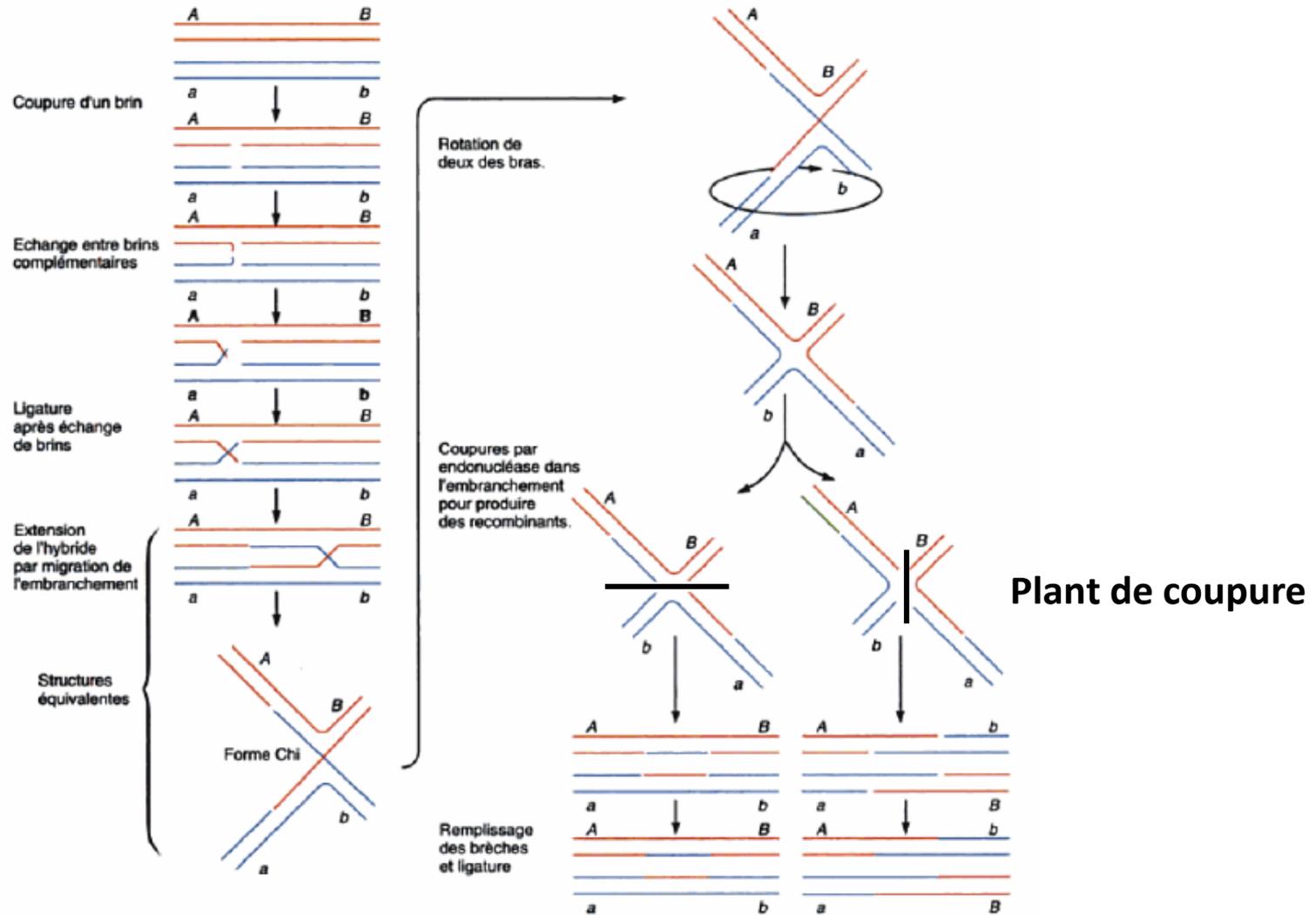
- L'ADN peut être intégrée au génome.
- L'ADN peut être maintenu de manière extra-chromosomique de manière diploïde.
- L'ADN peut être dégradé.



Intégration du plasmide F chez E-coli



La recombinaison homologue réciproque



La recombinaison homologue non réciproque

Model de Fox

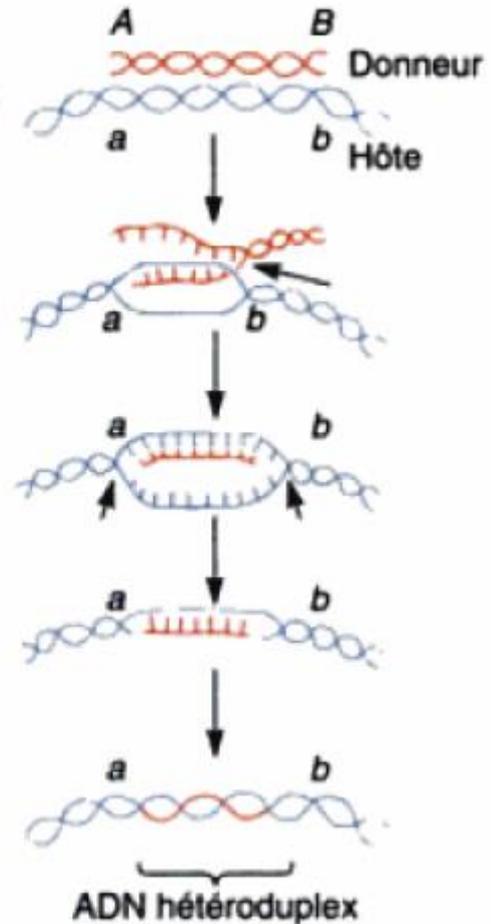
Association de segments homologues

Séparation de brins et appariement

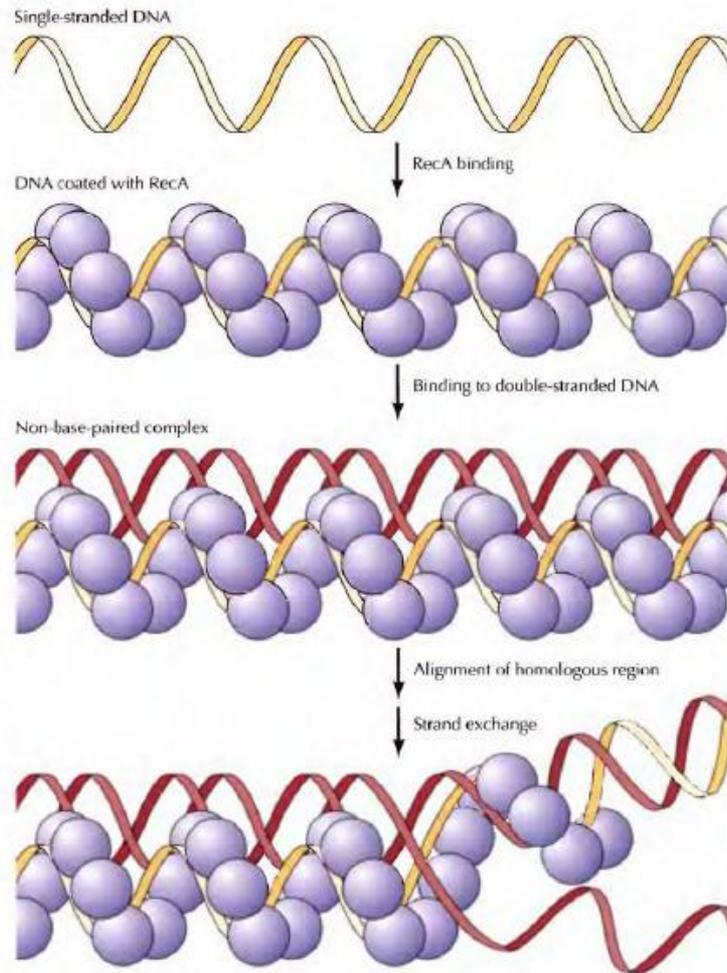
La flèche indique la coupure du brin du donneur par une endonucléase

L'endonucléase coupe le brin du receveur

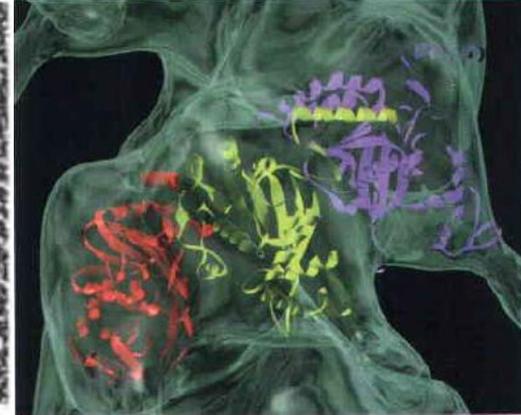
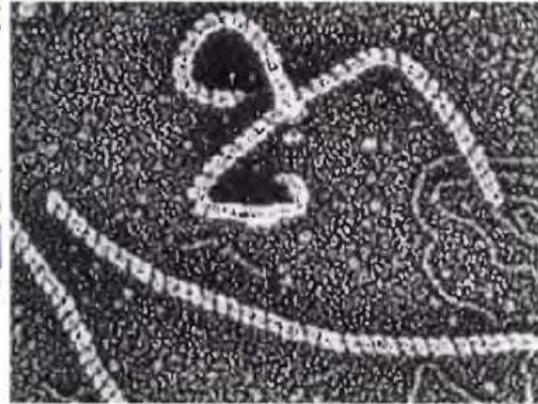
Remplissage des brèches et ligature



Le système RecA d'intégration de l'ADN



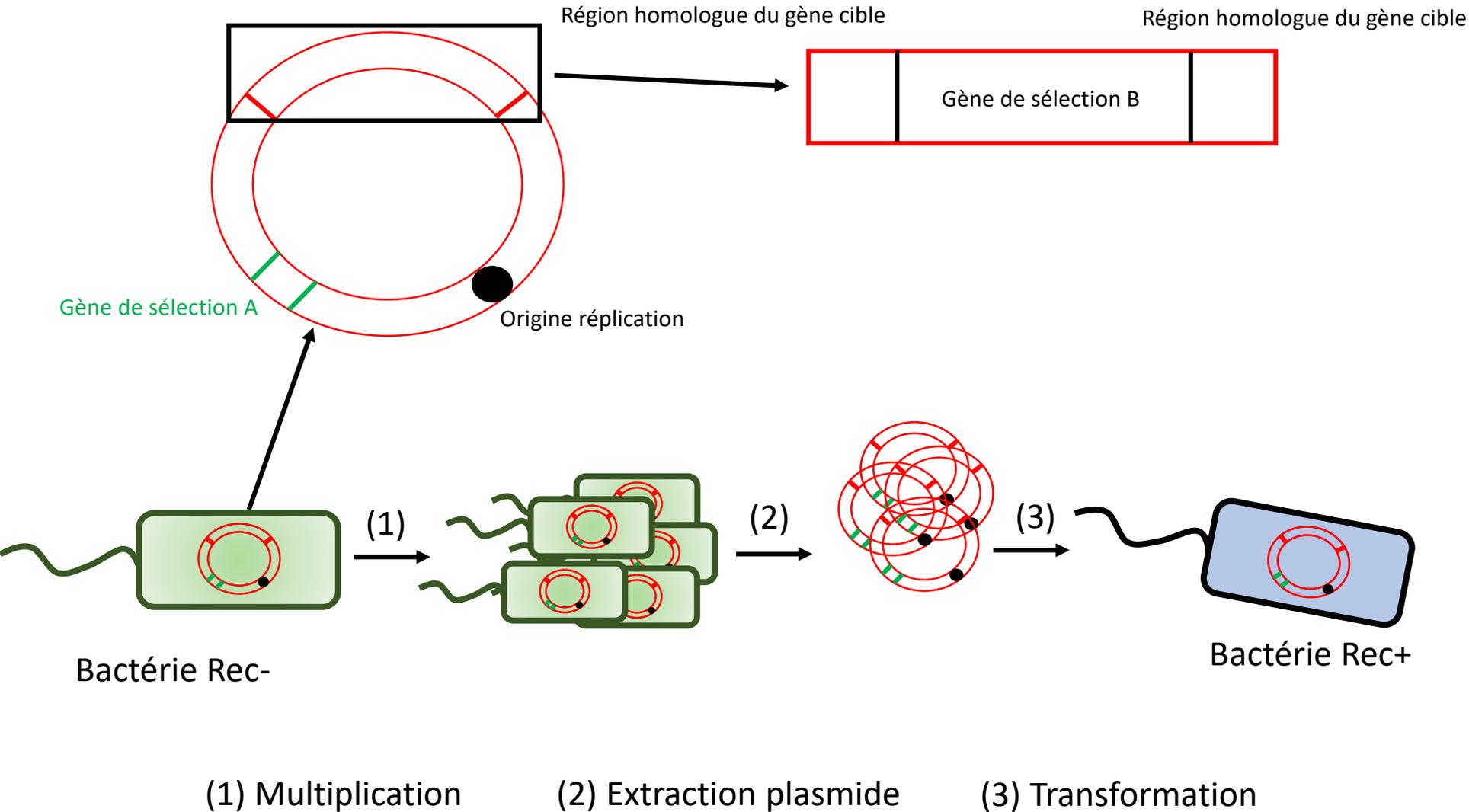
(A) Rec A



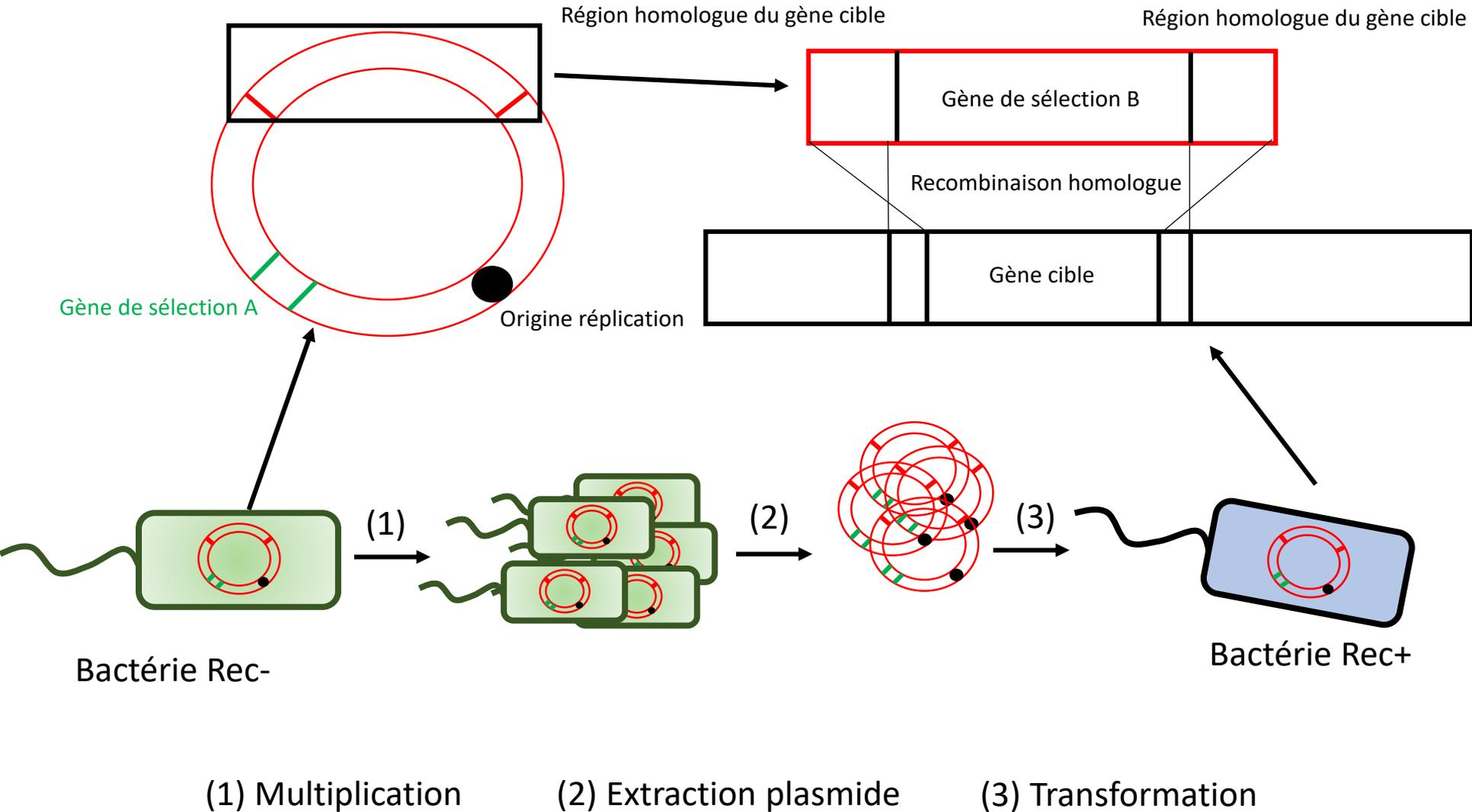
6 monomères de RecA
entouré de 18
nucléotide

Fonction des autres protéines
Rec

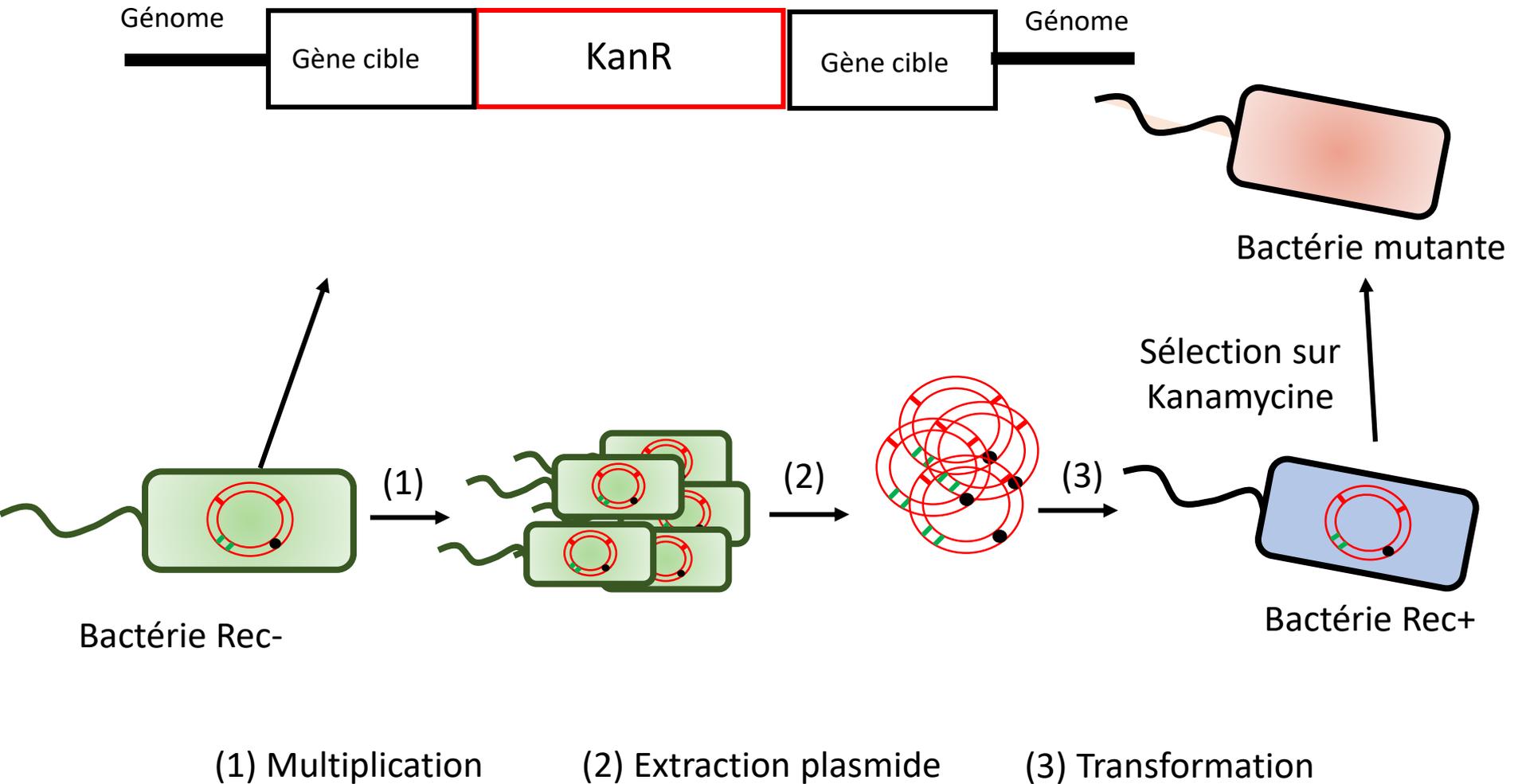
Principe de mutagénèse dirigé chez les bactéries



Principe de mutagénèse dirigé chez les bactéries



Principe de mutagénèse dirigé chez les bactéries



Générer des mutants

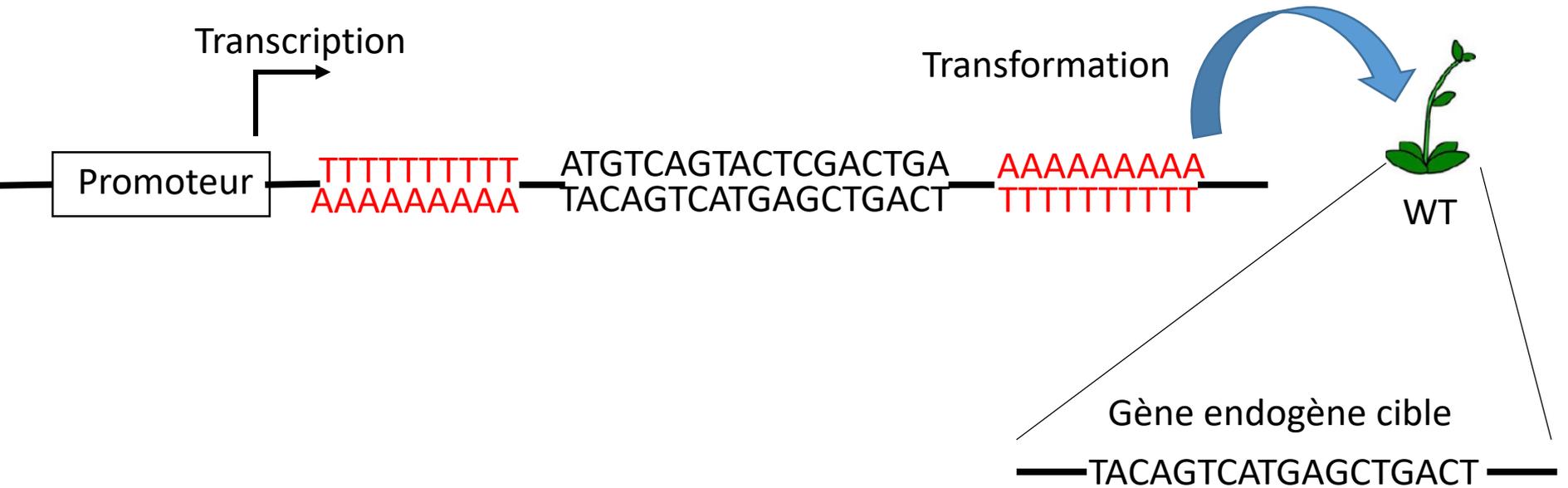
Mutagenèse Aléatoire (affecte de manière aléatoire les gènes)

- éthyle methanesulfonate (EMS)
- Mutagenèse faste neutron
- Mutagenèse UV
- Mutagenèse par insertion
 - Insertion T-DNA
 - Insertion de transposant

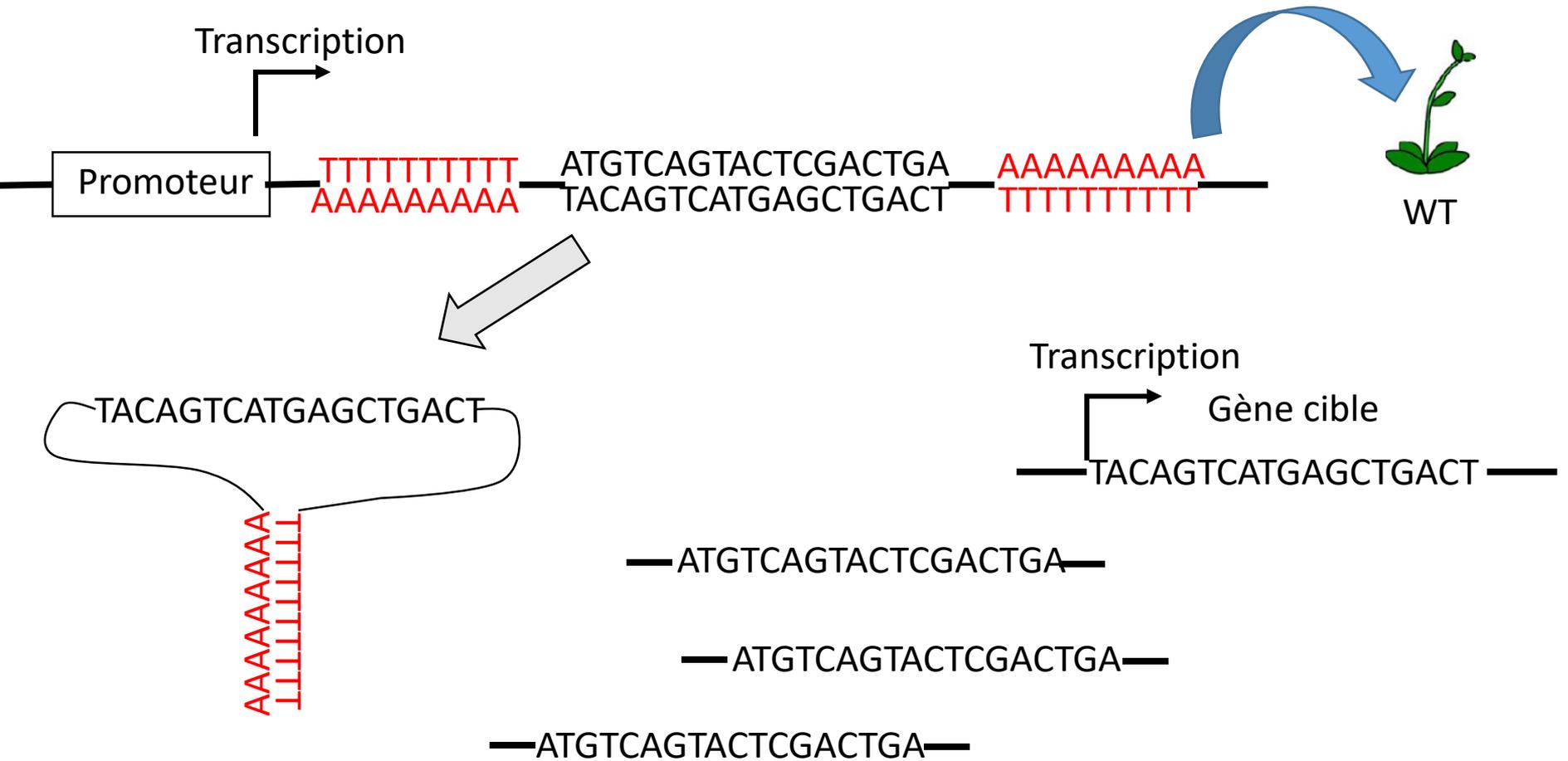
Mutagenèse dirigée (touche de manière ciblée certains gènes)

- Système bactérien
- RNAi
- Ribozyme
- CRISPER-CAS9

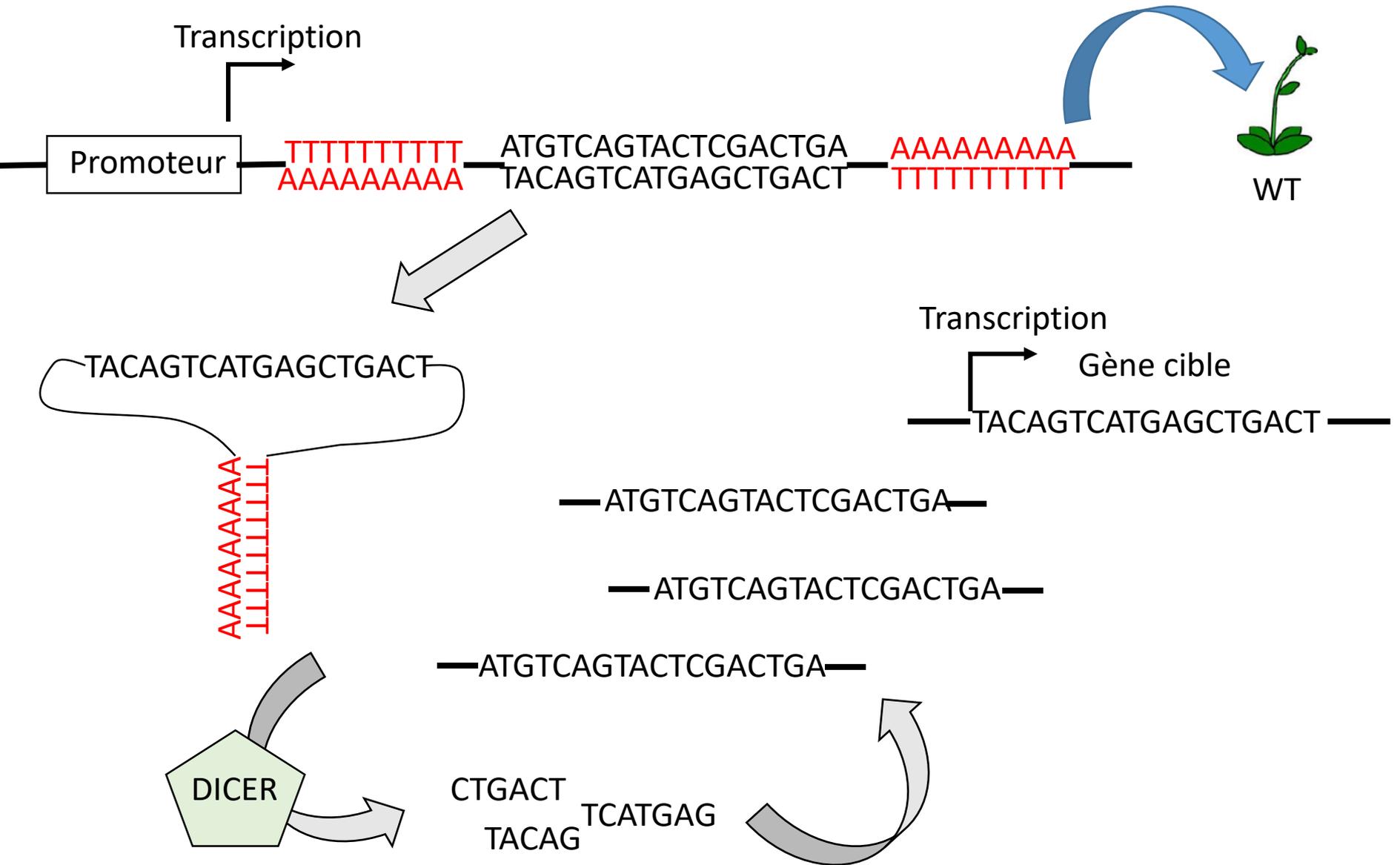
RNA interférence



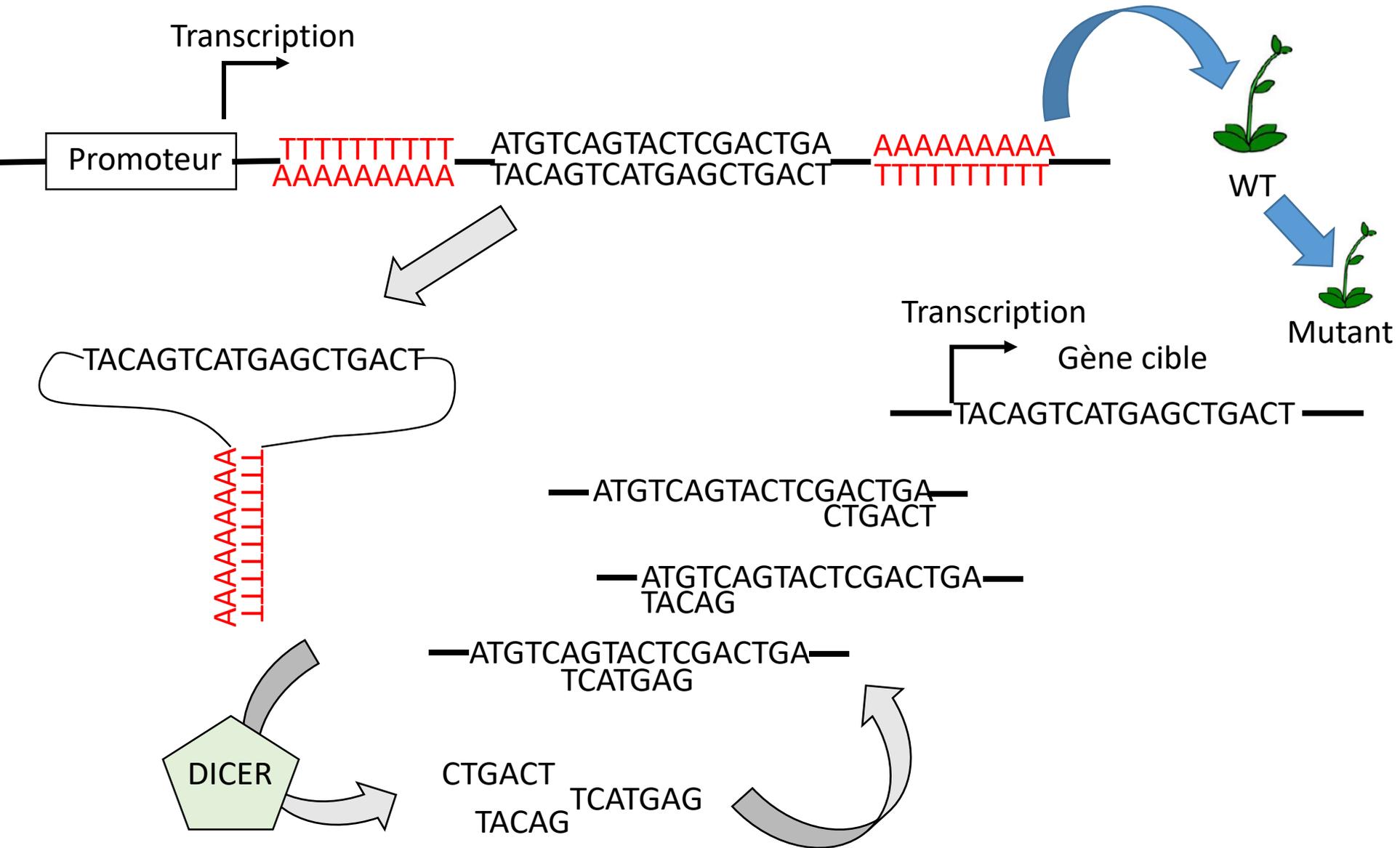
RNA interférence



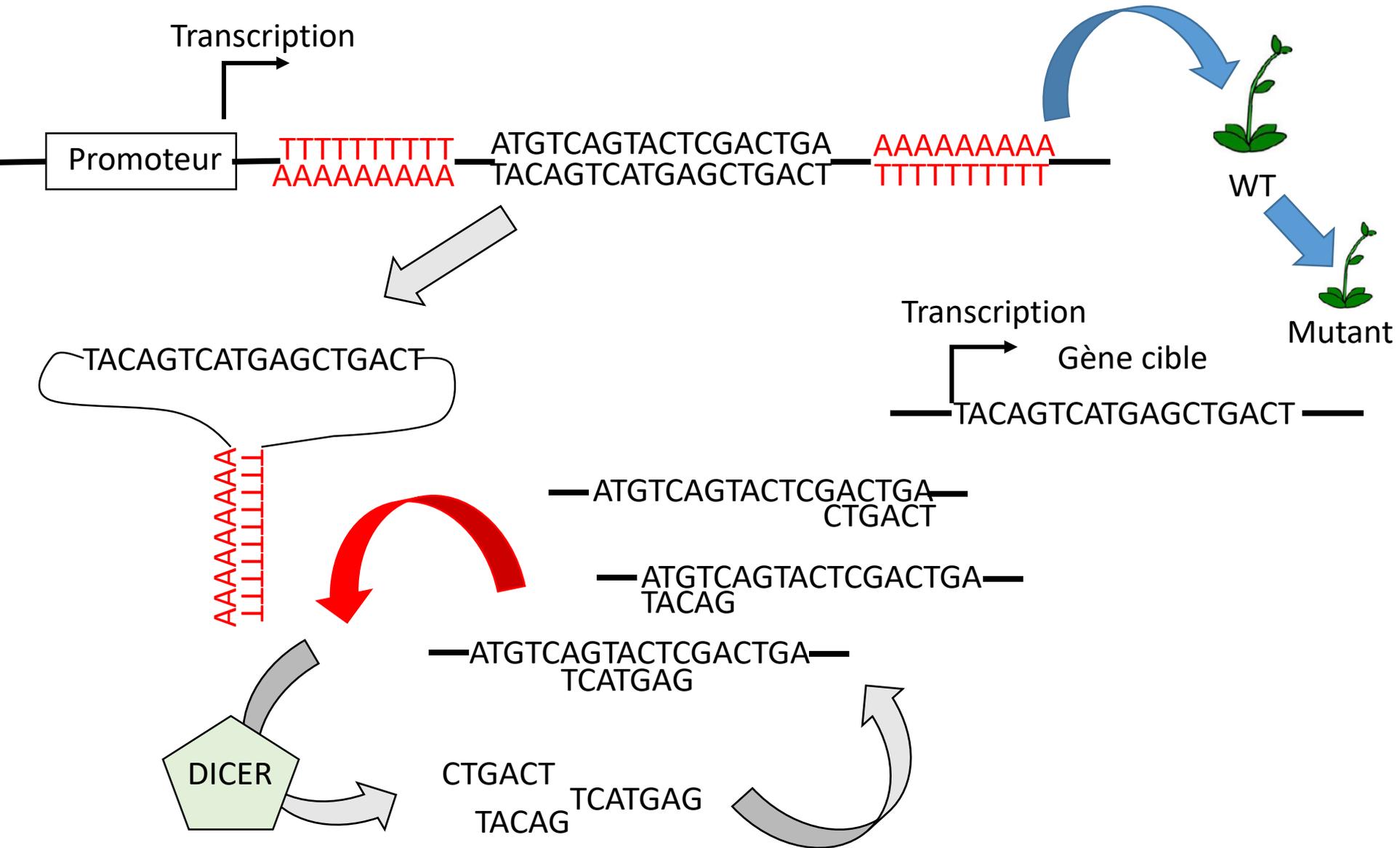
RNA interférence



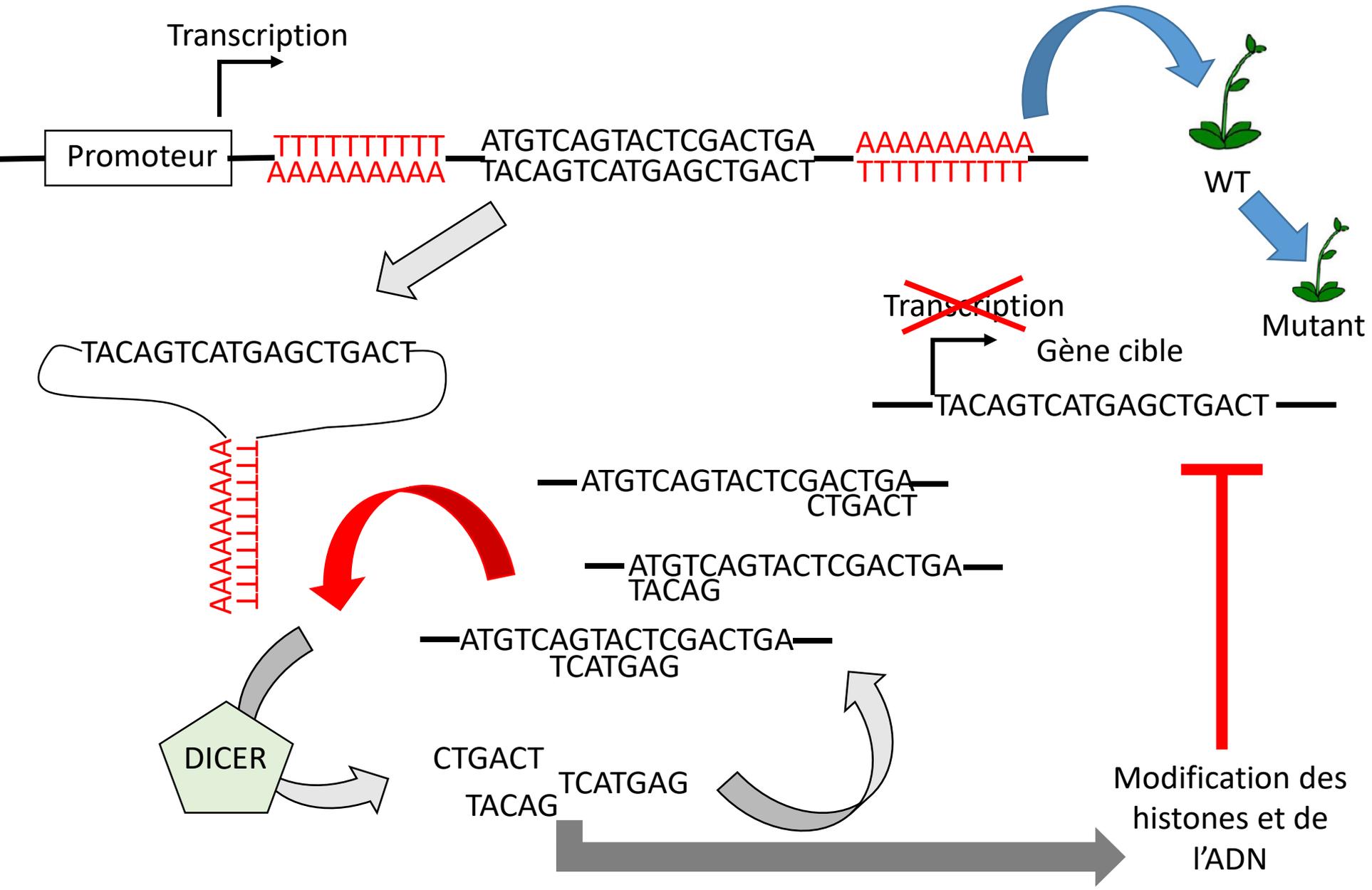
RNA interférence



RNA interférence



RNA interférence



Générer des mutants

Mutagenèse Aléatoire (affecte de manière aléatoire les gènes)

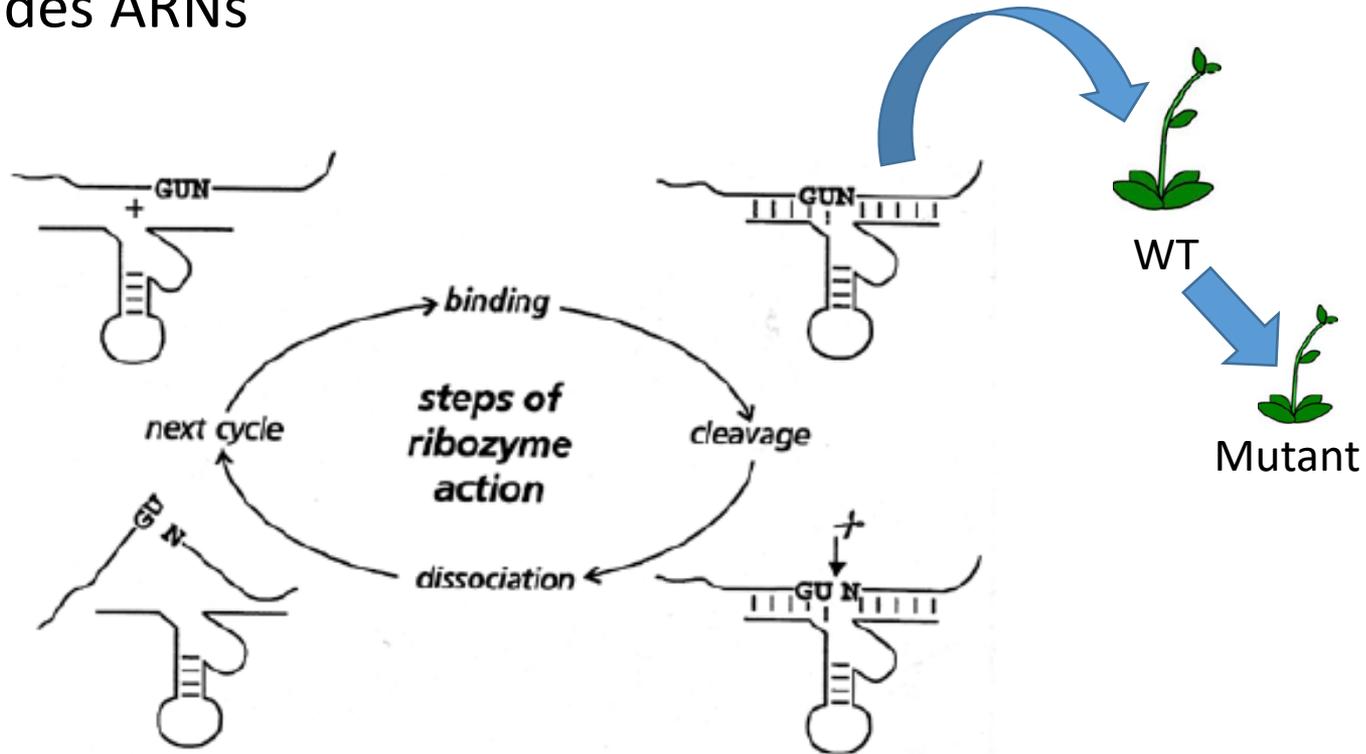
- éthyle methanesulfonate (EMS)
- Mutagenèse rapide neutron
- Mutagenèse UV
- Mutagenèse par insertion
 - Insertion T-DNA
 - Insertion de transposant

Mutagenèse dirigée (touche de manière ciblée certains gènes)

- Système bactérien
- RNAi
- Ribozyme
- CRISPER-CAS9

Mutagenèse Ribozyme

ARN dont la configuration lui confère une activité catalytique de clivage des ARNs



Générer des mutants

Mutagenèse Aléatoire (affecte de manière aléatoire les gènes)

- éthyle methanesulfonate (EMS)
- Mutagenèse rapide neutron
- Mutagenèse UV
- Mutagenèse par insertion
 - Insertion T-DNA
 - Insertion de transposant

Mutagenèse dirigée (touche de manière ciblée certains gènes)

- Système bactérien
- RNAi
- Ribozyme
- CRISPER-CAS9

Mutagenèse CRISPR-Cas

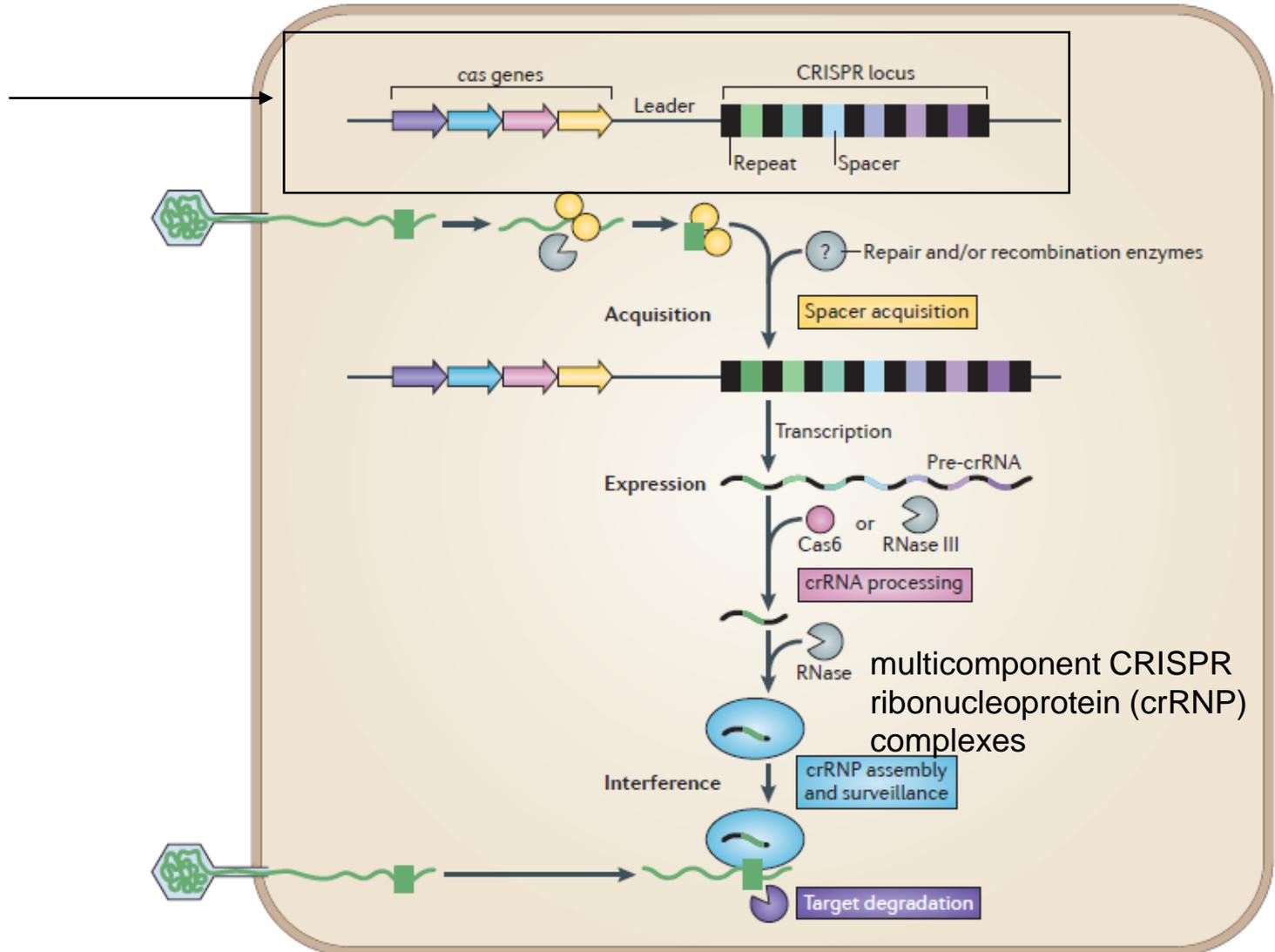
clustered regularly interspaced short palindromic repeats–CRISPR-associated proteins

Système de protection bactérien anti phage et ADN étranger, découvert en 2005 par trois équipes de recherche

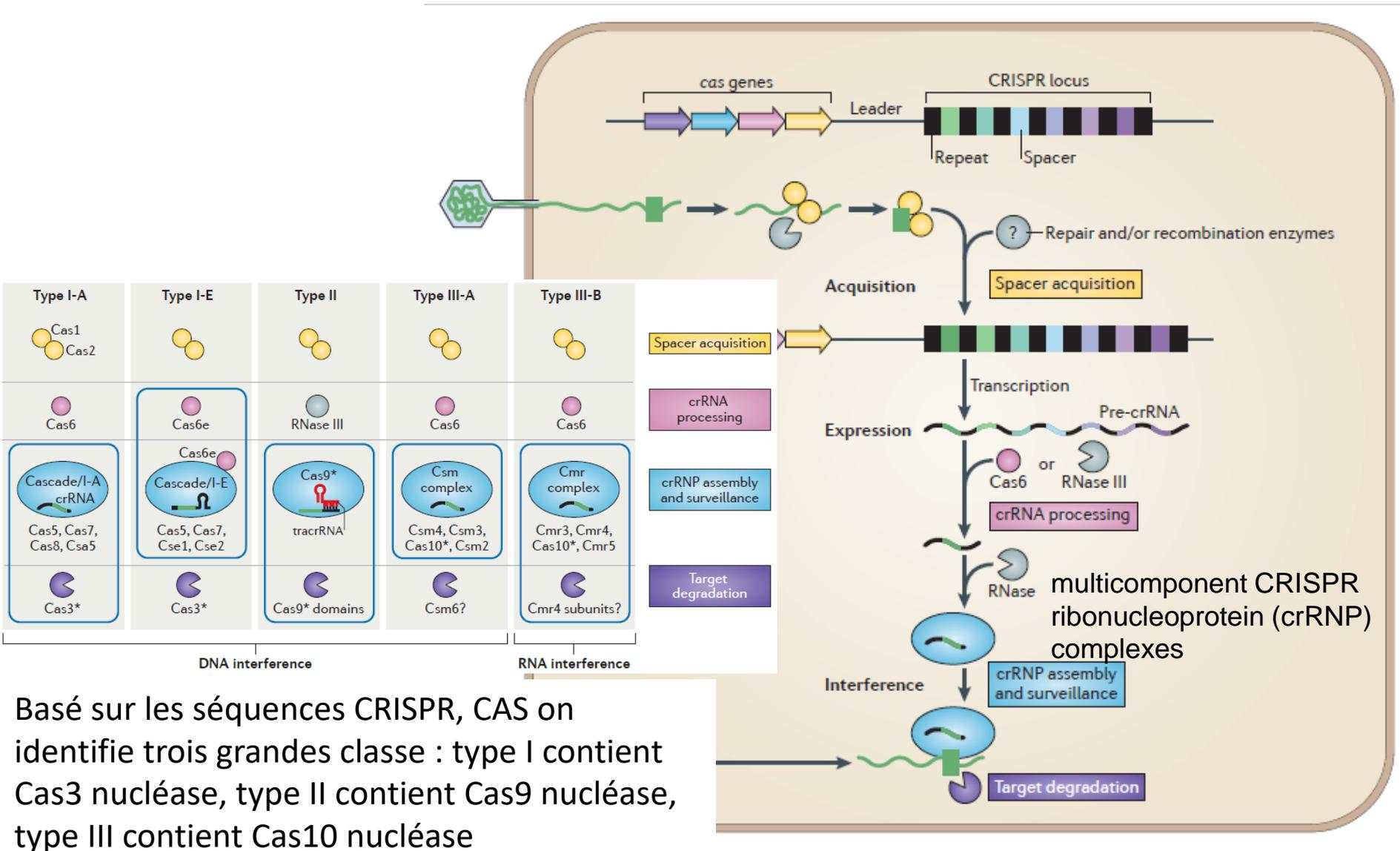
Basé sur les séquences CRISPR, CAS on identifie trois grandes classe : type I contient Cas3 nucléase, type II contient Cas9 nucléase, type III contient Cas10 nucléase

Fonctionnement du système CRISPR-Cas

Deux composant :
un operon Cas qui
code des nucléases
et un locus de
région répétées
CRISPR



Les types de système CRISPR-Cas



Basé sur les séquences CRISPR, CAS on identifie trois grandes classe : type I contient Cas3 nucléase, type II contient Cas9 nucléase, type III contient Cas10 nucléase

L'intégration de l'ADN étranger

CrRNA processing

CrRNP Assamblage et surveillance

Dégradation des ADN cibles

Mutagenèse CRISPR-Cas9

Fin du Chapitre II

La technique RFLP pour l'identification de mutation

