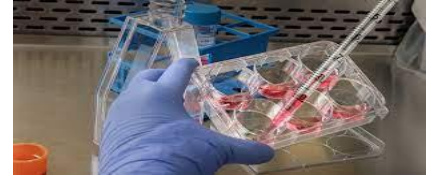




Génétique Microbienne
Génie Génétique
Chapitre II :
 Mutagenèse : Aspects Appliqués



II. Mutagenèse : Aspects Appliqués

Qu'est-ce que la mutagenèse ?

- Le terme **mutagenèse** regroupe plusieurs techniques qui visent à introduire volontairement des mutations génétiques chez un organisme vivant.

Qu'est-ce que la mutagenèse ?

- Les mutations sont la source de la variabilité dans une même espèce
- Une mutation est une modification de l'information génétique contenue dans l'ADN. Elle affecte la séquence par le remplacement d'un ou plusieurs nucléotides, **l'insertion** ou **la délétion** de quelque nucléotide.

Insertion : Action d'insérer ; son résultat, Mode d'attache.

Délétion : Perte d'un fragment plus ou moins important d'ADN, constituant une cause de mutation.

II.1.Mutations :

- **Mutations Spontanées (classique) :** Les mutations spontanées sont rares (10^6 , 10^7 par gène et par génération) mais néanmoins significatives. La mutation spontanée, également connue sous le nom de mutation de fond, peu être définie comme des modifications génétiques qui surviennent en l'absence de mutations n'ont pas de cause connue (Résulte d'un processus naturel).
- **Mutations Induites (dirigée) :** Elles peuvent être provoquées par des traitements physiques (UV, rayons X...) ou chimiques (divers agents alkylants...) qui augmentent significativement le taux de mutation (plus de 500 fois, par exemple, chez *Arabidopsis* par **Le méthanesulfonate d'éthyle – EMS**) et chez les bactéries par **le 5-bromouracile** (ou 5-BU). La probabilité de produire ou modifier un caractère intéressant pour le sélectionneur est alors ainsi fortement augmentée.

Agents alkylants : Les agents alkylants forment des liaisons covalentes directes avec l'ADN. Ces liaisons covalentes empêchent l'accès des polymérase à l'ADN par encombrement stérique ou conduisent à des coupures simples ou double brin de l'ADN.

Méthanesulfonate d'éthyle : Méthanesulfonate d'éthyle, souvent abrégé EMS, est un composé organique mutagène.

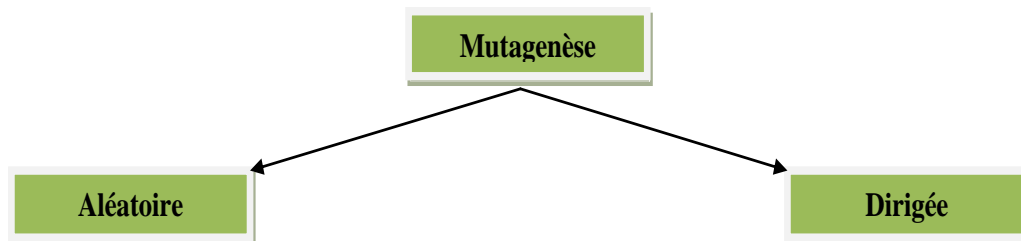
Arabidopsis : *Arabidopsis* est un genre de plantes herbacées de la famille des Brassicaceae

le 5-bromouracile : Le 5-bromouracile (5-BrU) est un dérivé bromé de l'uracile agissant comme antimétabolite ou analogue de base nucléique à la place de la thymine dans l'ADN susceptible d'induire **des mutations**.

Une mutation génétique est une modification de la séquence des bases d'une molécule d'ADN.

II.2.Mutagenèse : La mutagenèse, ou mutagenèse, est le processus d'apparition d'une mutation. Il peut être naturel ou artificiel. Dans la nature, ce processus peut être à l'origine du cancer, de maladies héréditaires ou d'innovations évolutives, et est le principal responsable de la biodiversité des espèces.

- La **mutagenèse** est l'induction d'une mutation par l'action d'un agent mutagène. Elle est la génération de mutations dans le matériel génétique des êtres vivants. La mutagenèse est utilisée en recherche biologique et médicale ainsi que dans la sélection afin d'obtenir les propriétés souhaitées.
- En **génétique**, la production de mutations sur l'ADN, clonées ou non, est appelée mutagenèse. Si elle est réalisée in vitro, ladite altération peut être réalisée de manière aléatoire (mutagenèse aléatoire), sur n'importe quelle séquence, ou de manière dirigée (**mutagenèse dirigée**) sur une séquence connue et en position d'intérêt.

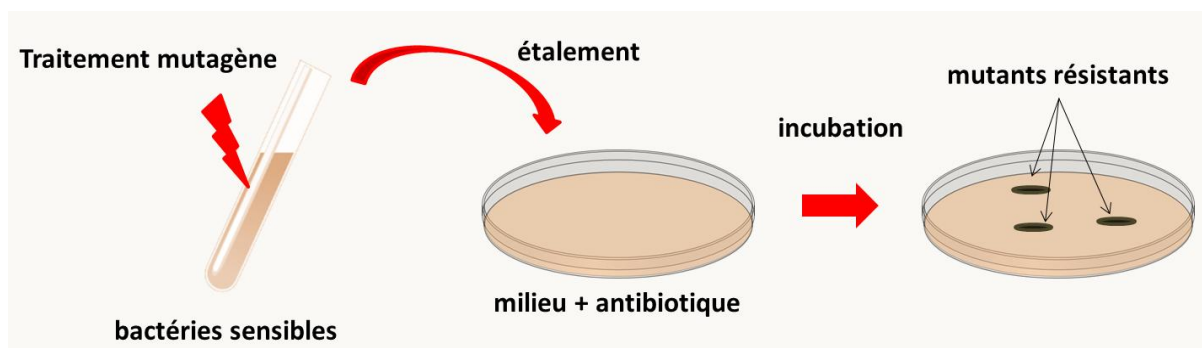


▪ **Mutagenèse aléatoire :**

- la mutagenèse aléatoire est une technique qui consiste à induire des mutations génétiques, afin d'obtenir un grand nombre de mutants, pouvant être par la suite sélectionnés. Ces mutations peuvent être obtenues en modifiant les propriétés du milieu (concentration en ions, enzymes...), par l'action de composés mutagènes chimiques ou encore par irradiation.
- Utilise un agent mutagène : qui induira aléatoire des mutations dans le génome de l'organisme étudié.

1. **Mutation** : Pas prévisibles (impossible).

2. **Mutation** : Pas contrôlés



Mutagenèse par irradiation (Crible de sélection positif pour sélectionner des mutants résistants).

Criblage : Technique Action de passer au crible, de trier par grosseur (Triage).

Triage : Séparation et regroupement.

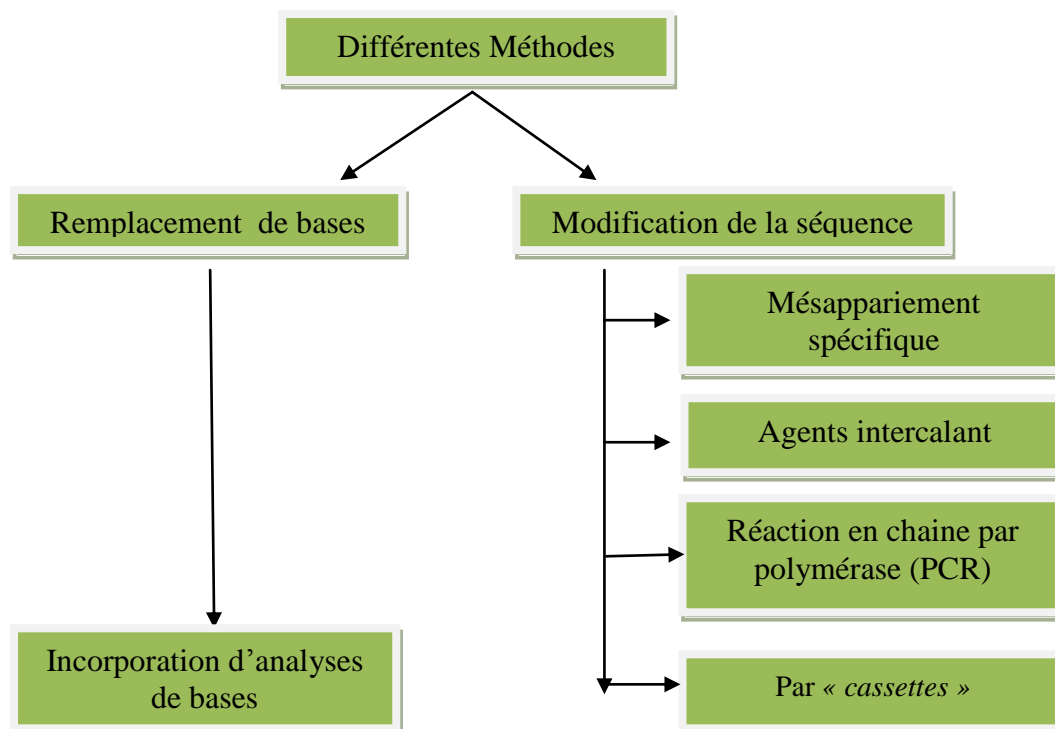
En microbiologie : Technique d'identification et de sélection de micro-organismes selon leurs propriétés.

▪ **Mutation dirigée :**

- La mutagenèse dirigée est l'induction d'une ou plusieurs mutations dans un génome, de façon précise et volontaire.
- La **mutagenèse dirigée** est l'introduction d'une mutation précise dans un fragment d'ADN cloné, suivie de la réinsertion de la séquence mutée dans le gène original en remplacement de l'ADN sauvage correspondant. Cette mutagenèse donne des organismes mutants.

- La mutagenèse dirigée suggère que les organismes vivants peuvent réagir en dirigeant des mutations environnementales d'une manière particulière d'évaluer des gènes spécifiques ou des régions spécifiques du génome.
- Utilisera des méthodes de biologie moléculaire pour induire une mutation précise dans le gène ciblé.

II.3. Les différentes méthodes :



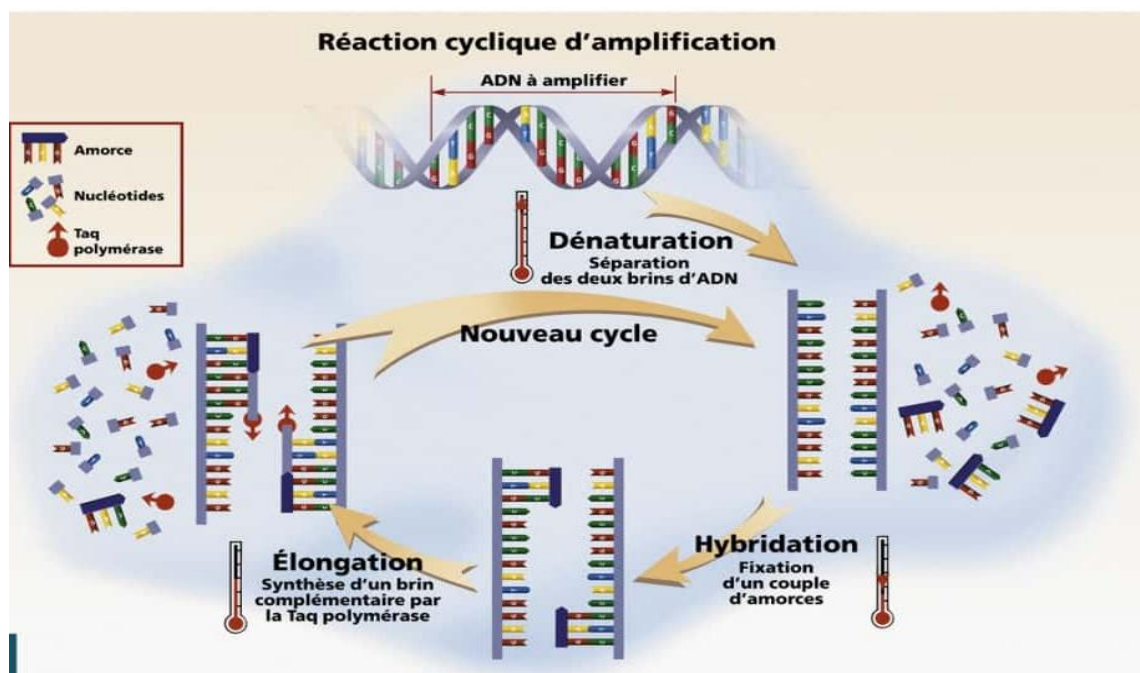
- a) **Remplacement de bases : Par l'incorporation d'analogues de bases :** Certains composés chimiques ressemblent suffisamment aux bases azotées pour être incorporés à leurs places dans l'ADN. Ce sont des analogues de bases qui pourront se lier à n'importe quelle base du brin complémentaire contrairement à la règle d'appariement des bases dans l'ADN. Ils peuvent donc provoquer l'insertion face à eux de nucléotides incorrects. Par exemple, le 5-bromouracile (ou 5-BU) est un analogue de la thymine et le 2-aminopurine (ou 2-AP) est un analogue de l'adénine.

b) Modification de la séquence d'ADN :

- ✓ **Mésappariement spécifique** : Certains mutagènes modifient une base pour qu'elle ne suive plus le principe d'appariement (A-T, G-C). Parmi ces mutagènes, on trouve des agents alkylants qui ajoutent des groupements **alkyles** sur les bases. D'autres agents chimiques peuvent provoquer la désamination (enlève un $-NH_2$) des bases.
- ✓ **Agents intercalant** : Ce sont des molécules capables de se glisser entre les bases azotées. Elles peuvent provoquer une inhibition du procédé de réplication de l'ADN. Par exemple, la proflavine et l'acridine orange.
- ✓ **PCR (Réaction en chaîne par polymérase)** : On utilise une amorce mutée qui permet de provoquer, à une position précise, la mutation voulue. Le gène ainsi modifié sera ensuite cloné un grand nombre de fois grâce à la réplication de l'ADN.
- ✓ **par « cassettes »** : On synthétise chimiquement des oligonucléotides complémentaires de façon à obtenir une petite séquence ADN double-brin appelée cassette, qui contient la mutation souhaitée. Cette cassette est ensuite insérée dans le gène cible.

II.4. Mutation par PCR:

➤ La PCR :



➤ Qu'est-ce que la mutagenèse dirigée par PCR ?

La mutagenèse dirigée par PCR (Réaction en chaîne par polymérase) est une technique de biologie moléculaire qui permet de créer des mutations de manière ciblée au niveau de l'ADN, notamment par des substitutions, insertions ou délétions de nucléotides.

- Cette méthode est largement utilisée dans la recherche scientifique, notamment pour déterminer le rôle d'une région spécifique ou d'un acide aminé particulier dans la fonction d'une protéine d'intérêt.
- Concrètement, si on souhaite par exemple remplacer un acide aminé dans une protéine par un autre (substitution), on ne va pas muter l'acide aminé en question au niveau de la protéine déjà produite, mais on va muter au niveau du gène le codon qui code cet acide aminé. Ainsi, l'intervention se fait au niveau de la molécule d'ADN plutôt qu'au niveau de la protéine elle-même. Par la suite, le gène muté est exprimé au sein d'une cellule hôte, produisant ainsi une protéine mutante dont les effets de la mutation peuvent être étudiés.

➤ Comment cela se fait techniquement ?

- Pour réaliser une mutagenèse dirigée on utilise la PCR. C'est pour cela qu'on parle de mutagenèse dirigée par PCR.
- Trois PCR sont nécessaires pour réaliser une mutagenèse dirigée.
- Dans un premier temps deux PCR sont réalisées en parallèle dans deux tubes de PCR séparés. Le gène à muter est utilisé comme ADN matrice dans les deux réactions de PCR:

1. PCR1 avec le couple d'amorces 1 et 4.
2. PCR2 avec les amorces 2 et 3.

➤ Les trois PCR :

- **La PCR1:** permet d'obtenir le fragment partiel 1 qui porte la mutation (figure 1).
- **La PCR2:** permet d'obtenir l'autre fragment partiel 2 qui porte aussi la mutation et qui présente une région commune avec le fragment 1 (figure 1).
- **La PCR3 de fusion:** les deux fragments partiels issus des deux PCR, 1 et 2, sont purifiés, puis mis ensemble dans le mélange de la PCR3. Les amorces 3 et 4 sont utilisées dans cette dernière PCR. La PCR3 s'appelle **PCR de fusion** car elle permet de fusionner les fragments partiels 1 et 2, afin d'obtenir le fragment d'ADN entier portant la mutation (figure 2).

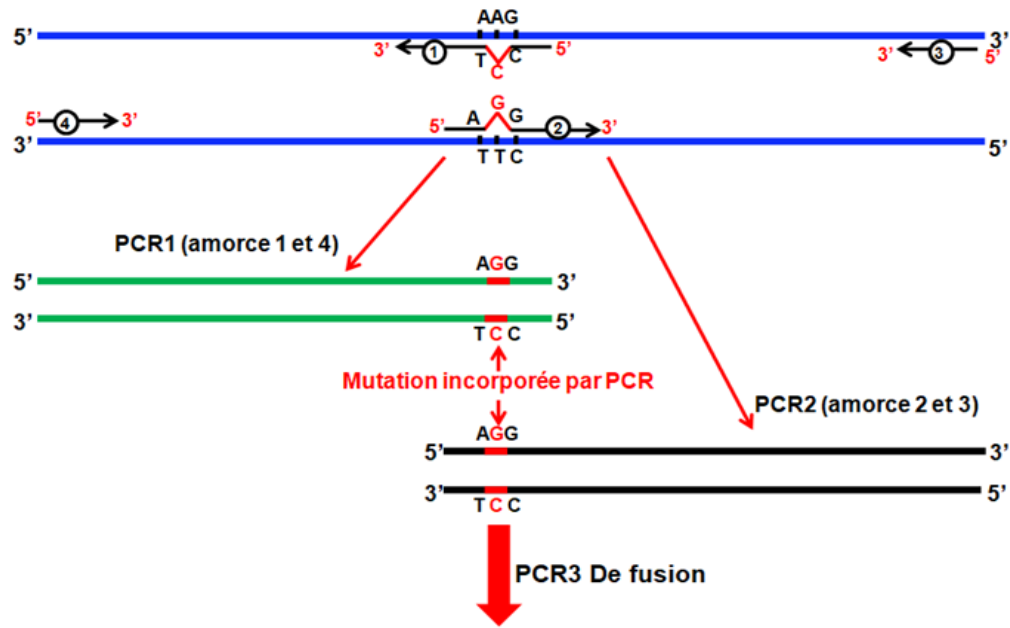


Figure: Substitution du codon AAG (Lysine) en AGG (Arginine) par mutagenèse dirigée. Les amorces 1 et 2 portent la mutation. Les amorces 3 et 4 délimitent le fragment à amplifier.

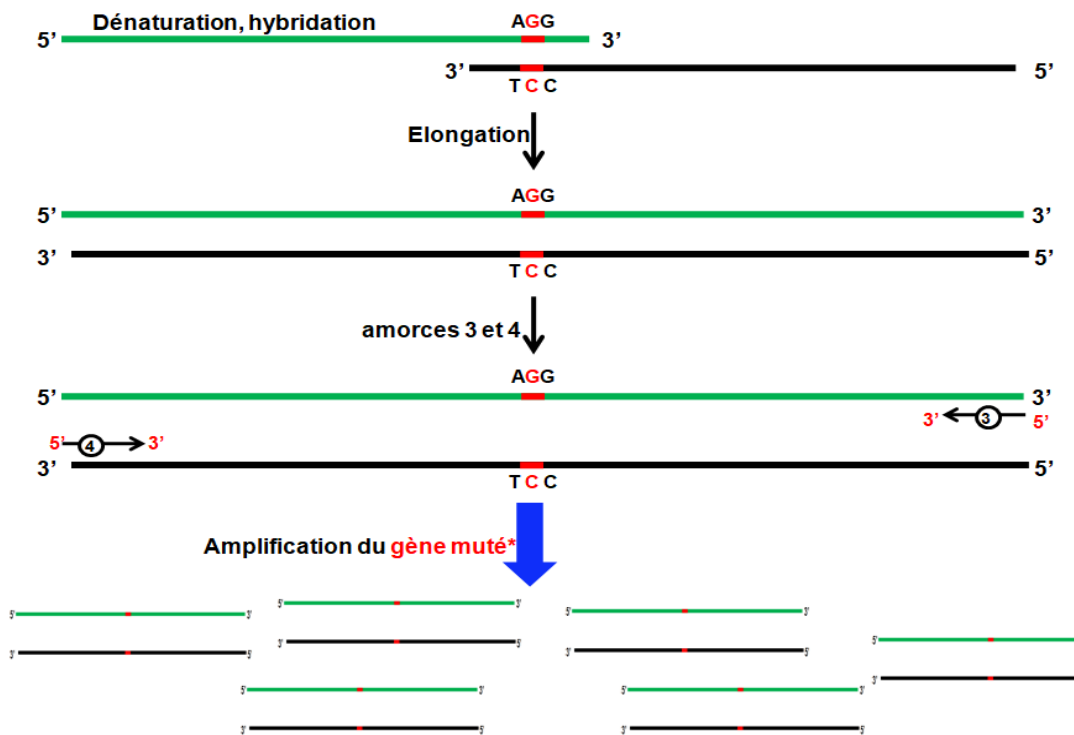


Figure2: PCR fusion.

- Dans la PCR de fusion, pendant le premier cycle, lors de la première dénaturation, les brins de chacun des fragments partiels 1 et 2 se séparent.
- Ensuite lors de l'hybridation, un brin du fragment partiel 1 peut s'hybrider avec un brin du fragment partiels 2 au niveau de **la région commune**.
- Une des possibilités est d'avoir une hybridation entre les extrémités 3' d'un brin du fragment 1 et un brin du fragment 2 (figure 2). Cette possibilité permet à l'ADN polymérase, lors de l'élongation, de compléter la synthèse des deux brins à partir des extrémités 3'OH libres. Cela permet d'obtenir une copie du gène entier portant la mutation.
- A partir du deuxième cycle de la PCR de fusion, cette copie du gène entier et muté, servira d'ADN matrice et sera amplifiée grâce aux amorces 3 et 4.
- Des sites de restriction pourraient être ajoutés aux extrémités 5' des amorces 3 et 4. Ainsi, le produit de la PCR de fusion (**gène muté***) sera délimité de part et d'autre par ces sites de restriction. Cela permet son clonage dans un vecteur d'expression.