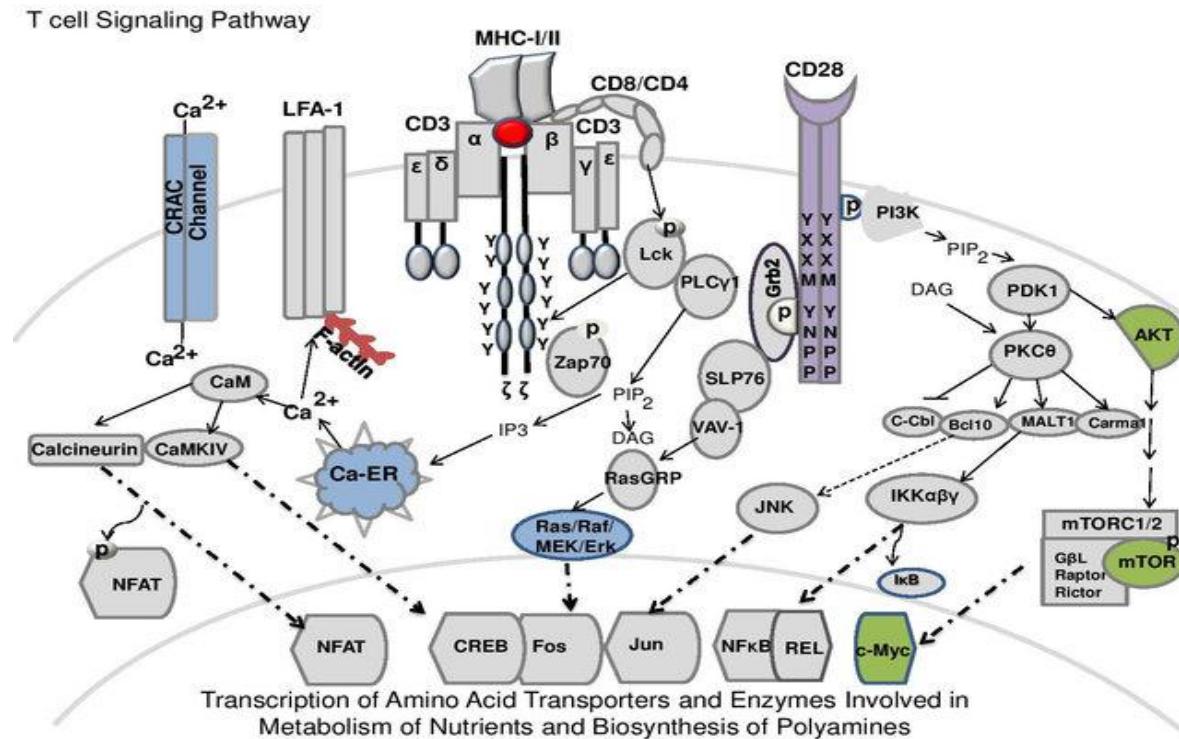


# Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

## Master 1 Sciences Pharmacologiques

### Module : CVSC (Communication et Voies de Signalisation Cellulaire)

#### Mutagenèse



## 1-Mutagenèse aléatoire :

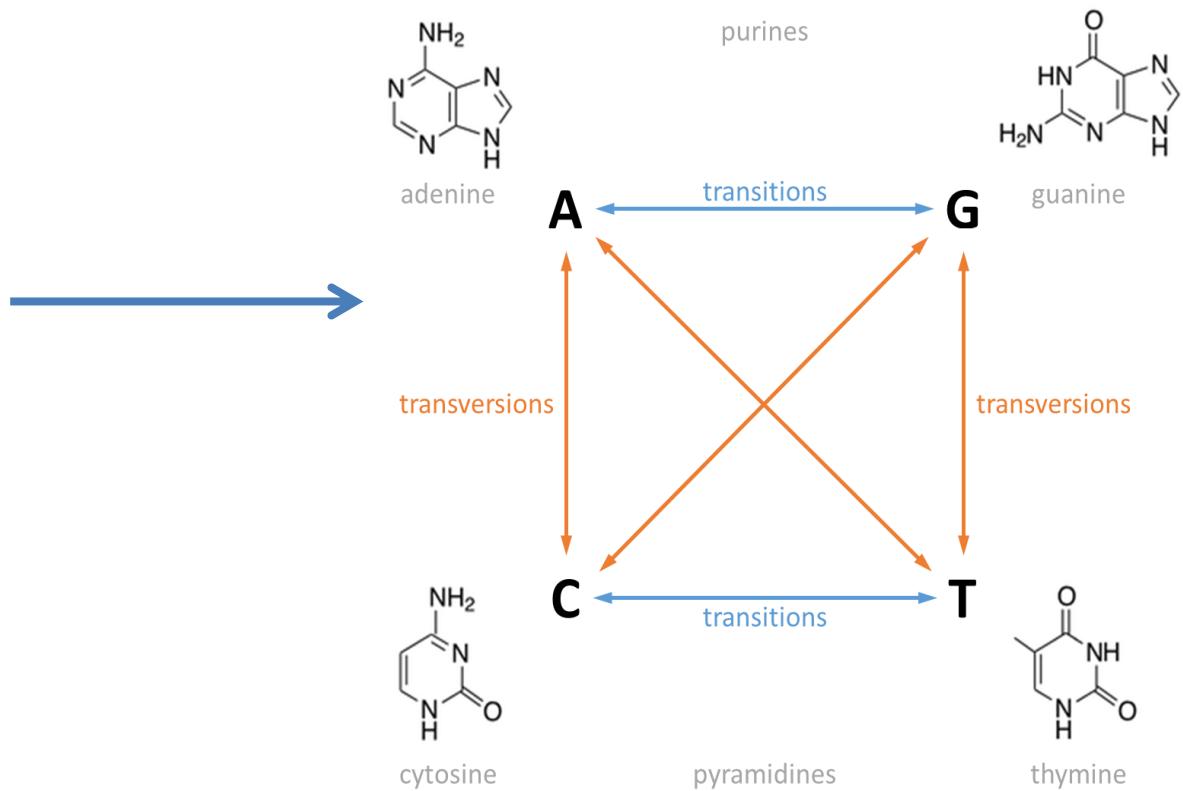
La reconnaissance de la séquence n'est pas requise

### Types d'altérations :

➤ Mutations ponctuelles



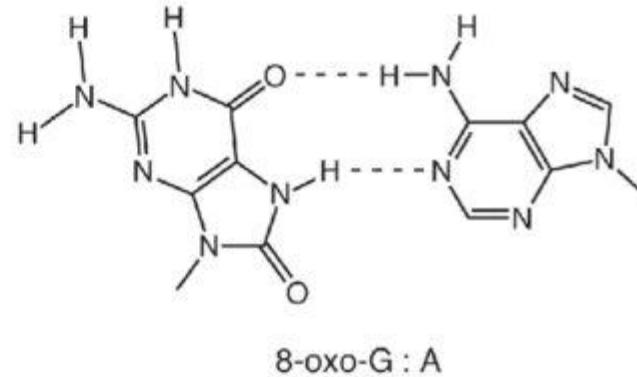
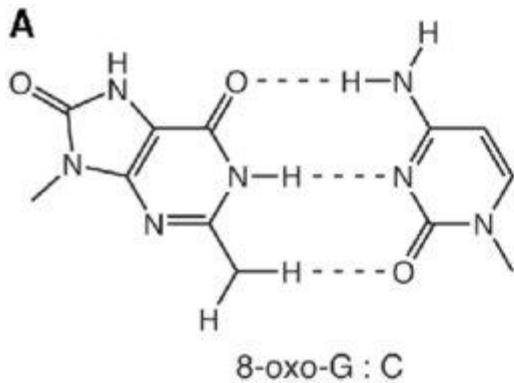
➤ Insertion et délétion de nucléotides



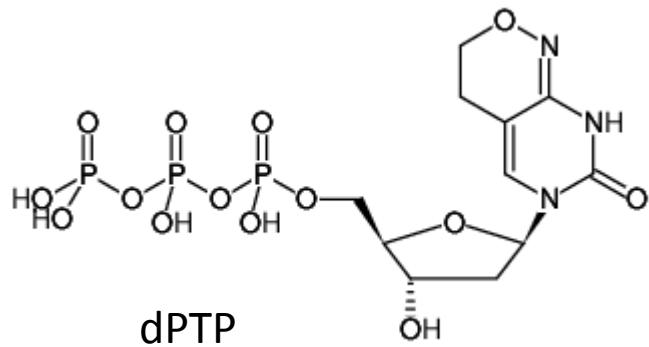
## Agents mutagènes :

- Souche mutagène : exp: XL1-red, Stratagene
- Agents physiques : exp : UV → Formation de dimères de T
- Agents chimiques : exp : Diméthyl Sulfate → Méthyl N3A  
Acide nitrique → Désamination A, C, G
- PCR

## Analogue de dNTP :



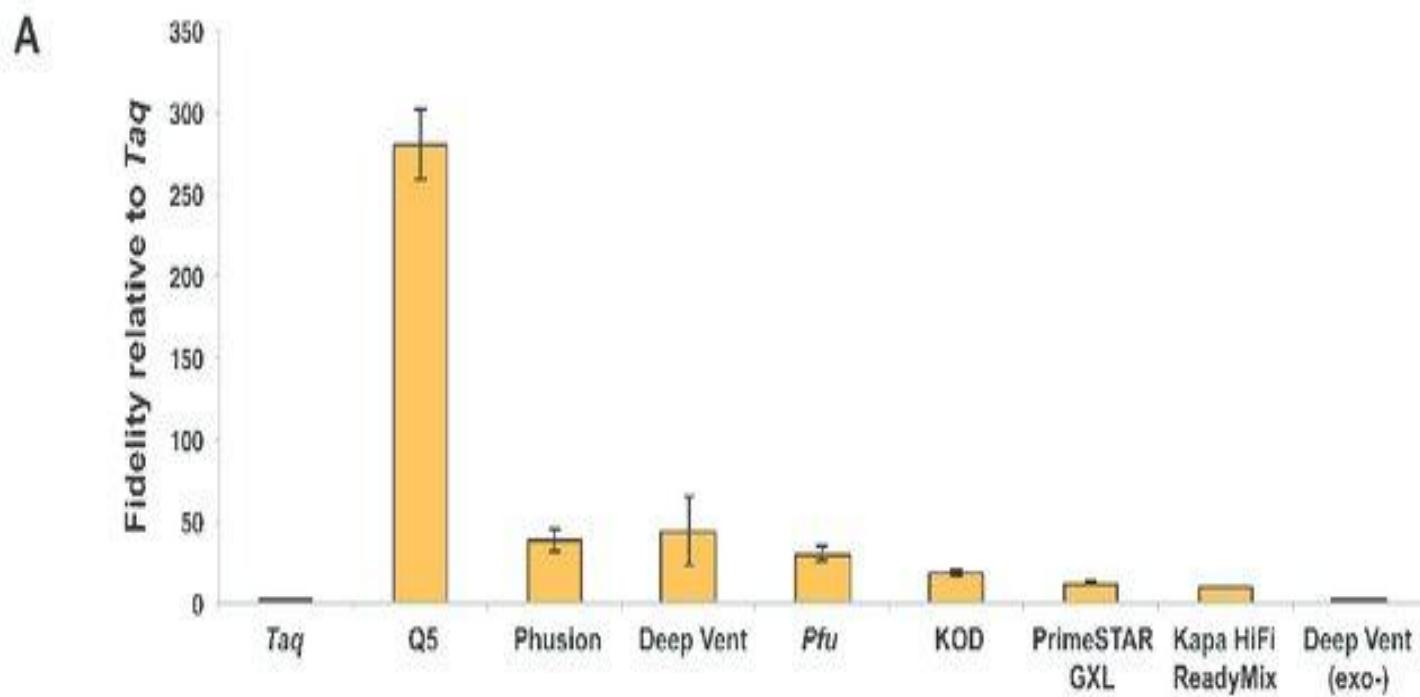
Misappariement avec A et C



- L'utilisation des deux molécules ensemble permet d'atteindre un taux d'erreur de 20 %.
- On peut affiner le taux de mutations en augmentant le nombre de cycles de PCR.

Misappariement avec A et G

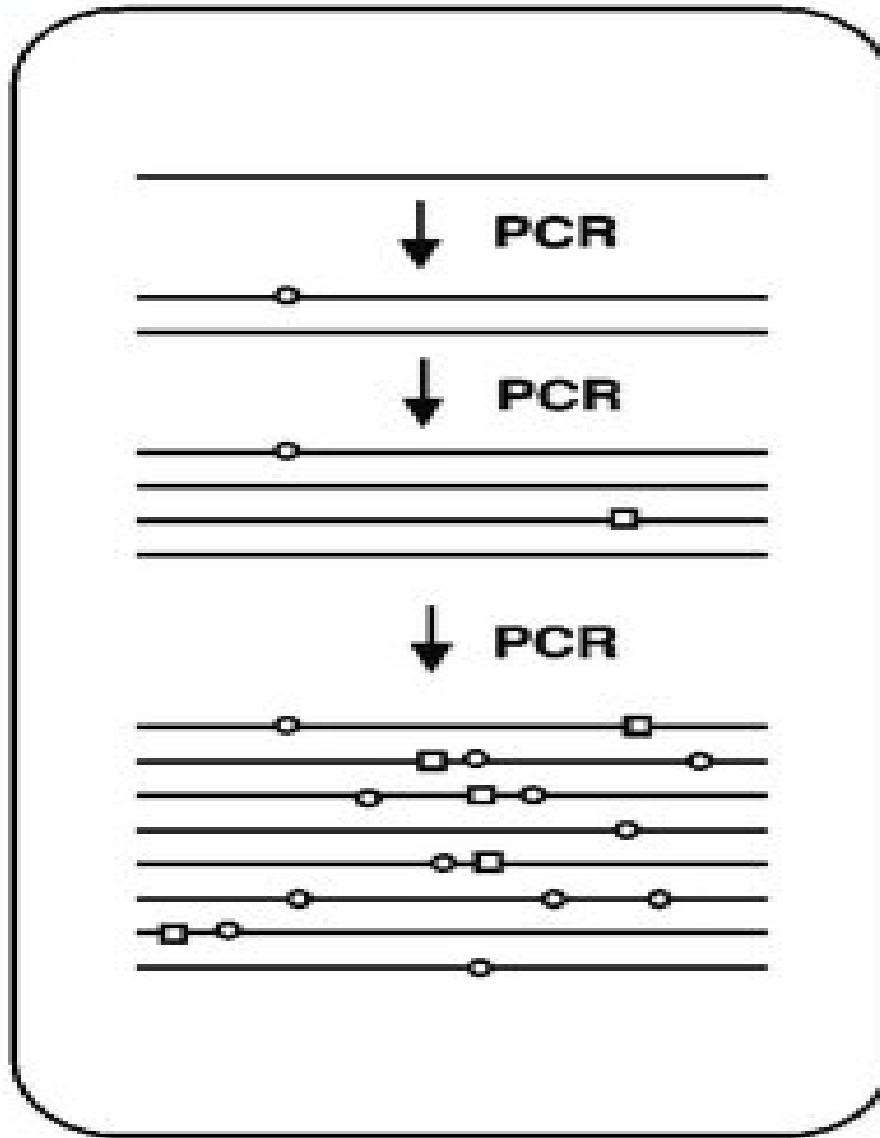
## La Taq polymérase :



## Mesures de fidélité et spectre de mutation des ADN polymérasées.

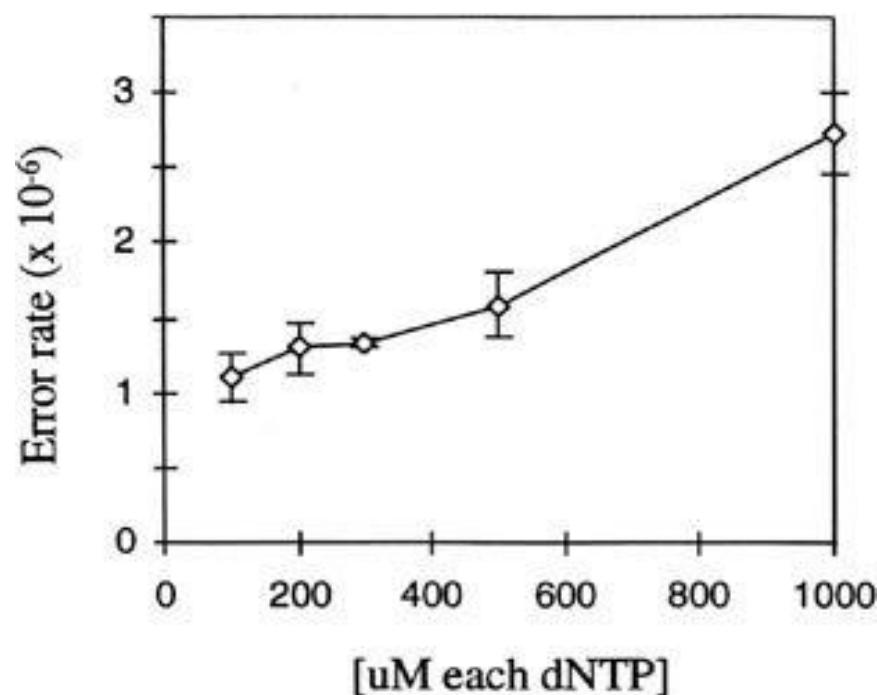
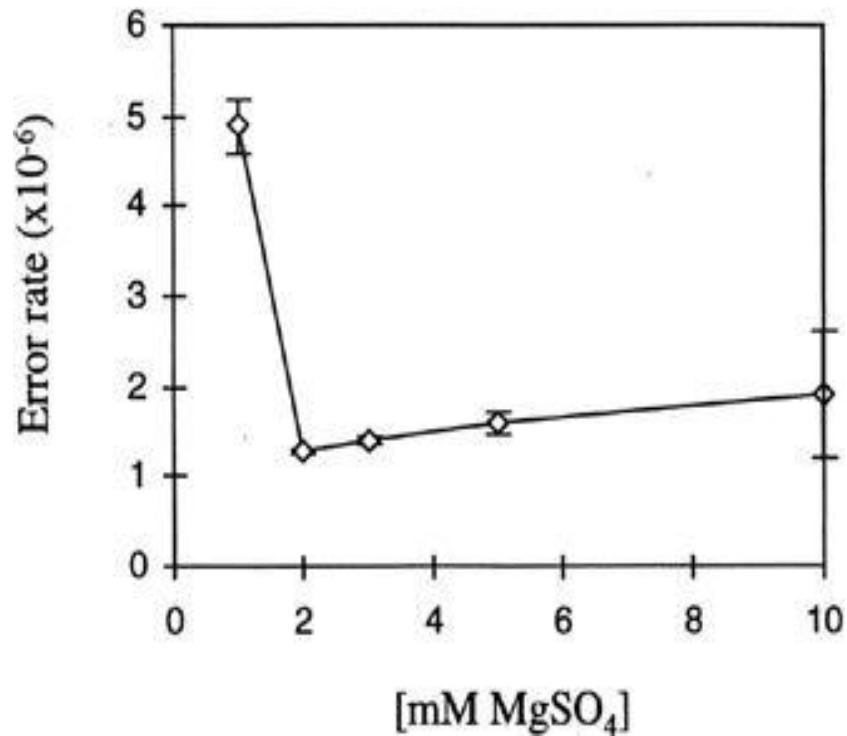
La Taq constitue l'outil de choix pour l'introduction des mutations (pas de proof-reading)

## A- PCR pro-erreurs (*Error-prone PCR*) :



**Normal mutagenesis**  
(e.g. error prone PCR)

## A- PCR pro-erreurs (*Error-prone PCR*) :



## A- PCR pro-erreurs (*Error-prone PCR*) :

- Simplicité d'utilisation
- Faible taux mutationnel obtenu sur le gène d'intérêt (Mutations ponctuelles +++) → moins de mutations rapprochées les unes des autres → moins de diversité mutationnelle.

### Exemple de Epr PCR :

7 variants améliorés ont été obtenus pour la sous-unité HycE de l'hydrogénase-3 d'E.coli.

La production d'hydrogène a été multipliée 17 fois par rapport à celle de la protéine initiale.

8 mutations sont impliquées dans cette amélioration (Maeda et al., 2008).

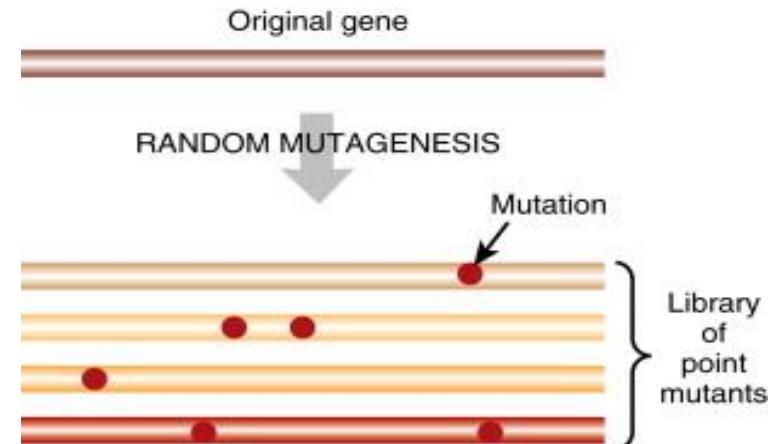
## B- Brassage génétique (*DNA Shuffling*) :



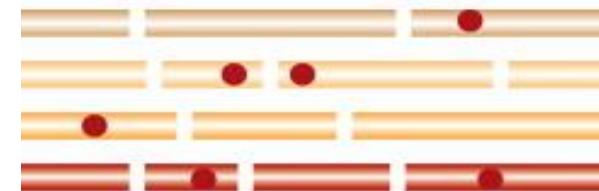
PARTIAL DIGESTION WITH DNASE I OR RESTRICTION ENZYMES



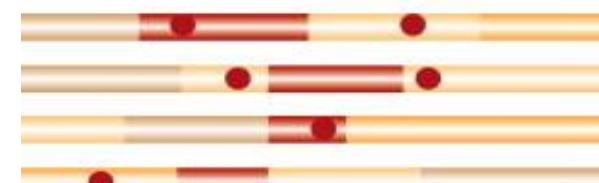
REASSEMBLY BY PCR



PARTIAL DIGESTION WITH DNASE I OR RESTRICTION ENZYMES



RECOMBINE BY OVERLAP PCR USING FRAGMENTS AS PRIMERS



*Exemple:*

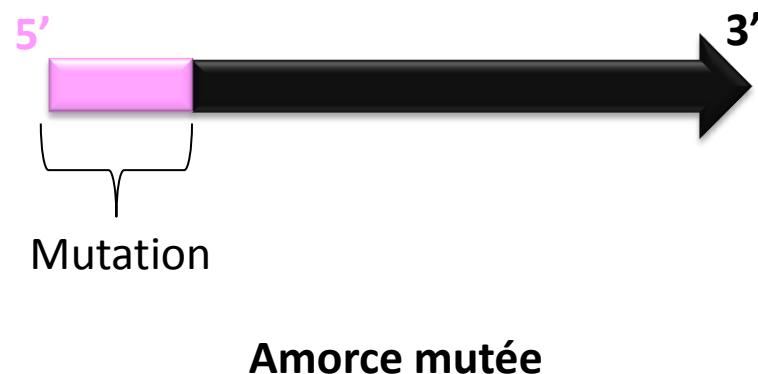
Génération de mutants enzymatiques aux propriétés 40 fois supérieures à celles de l'enzyme parente pour la dégradation de l'arsenate, .

## 2-Mutagenèse dirigée :

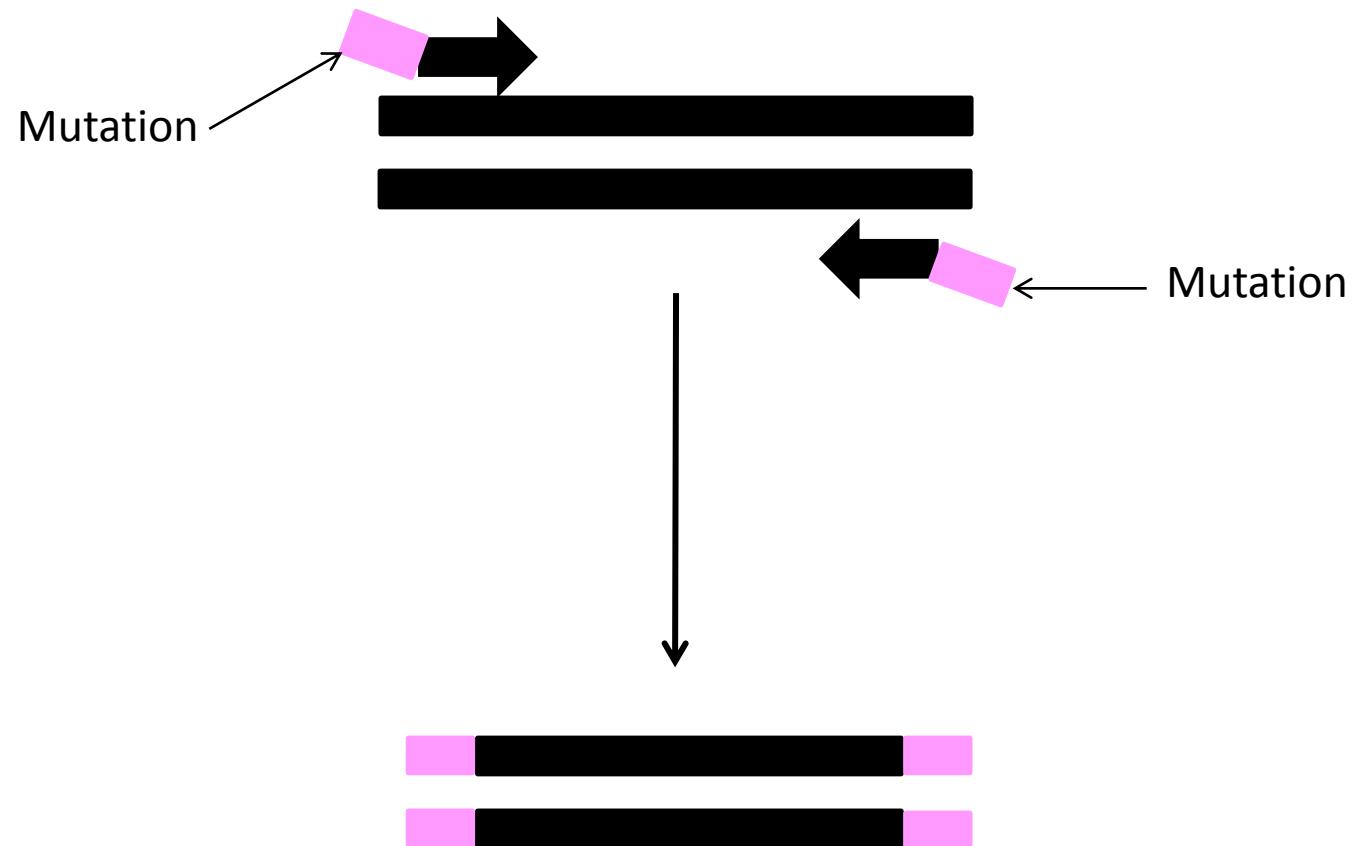
Données préalables (séquence, structure): nécessaires.

### Amorce mutée :

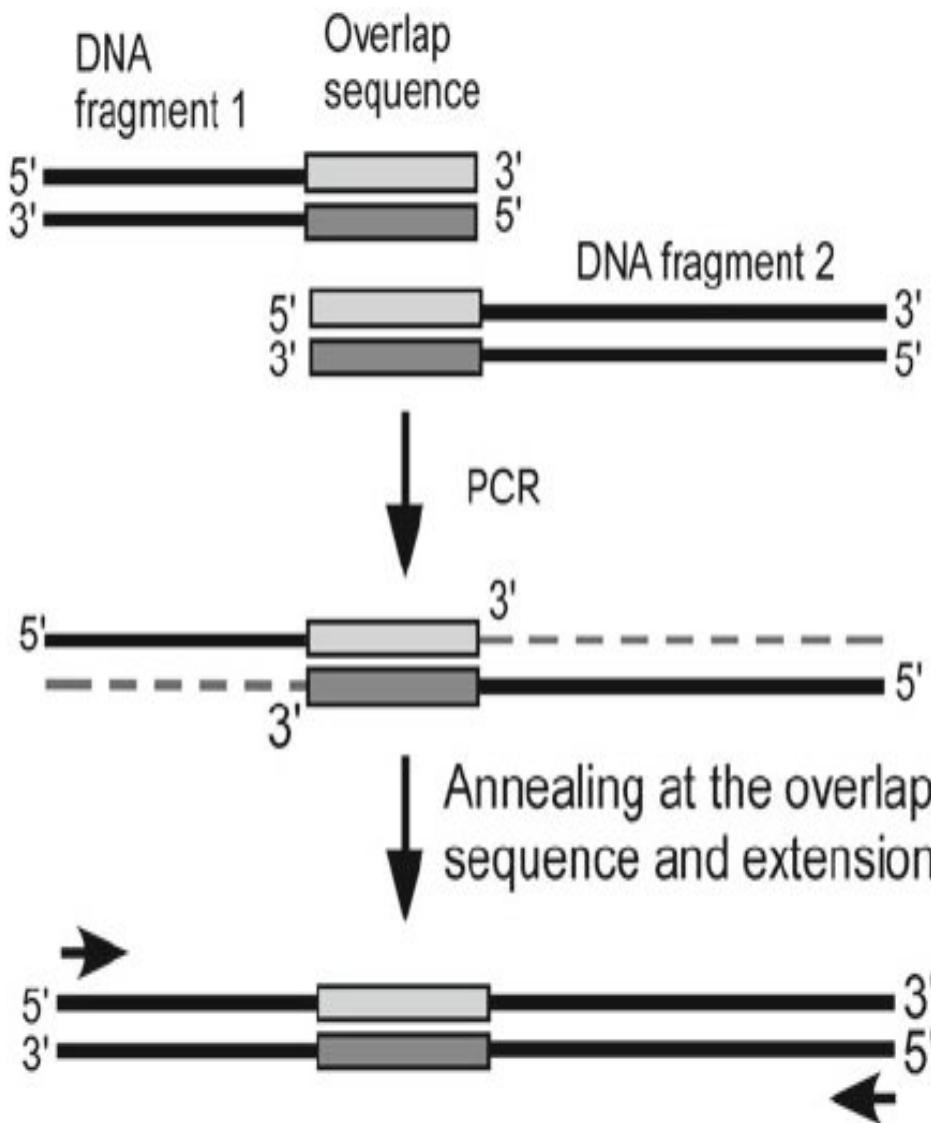
- 1) l'extrémité 3' : complémentaire de la séquence de matrice à amplifier.
- 2) l'extrémité 5' : peut porter des mutations ponctuelles, des sites de restriction, des séquences de recombinaison, etc.



## Mutations aux extrémités d'un fragment d'ADN :



## Mutations à l'intérieur d'un fragment d'ADN :



## Mutations à l'intérieur d'un fragment d'ADN :

