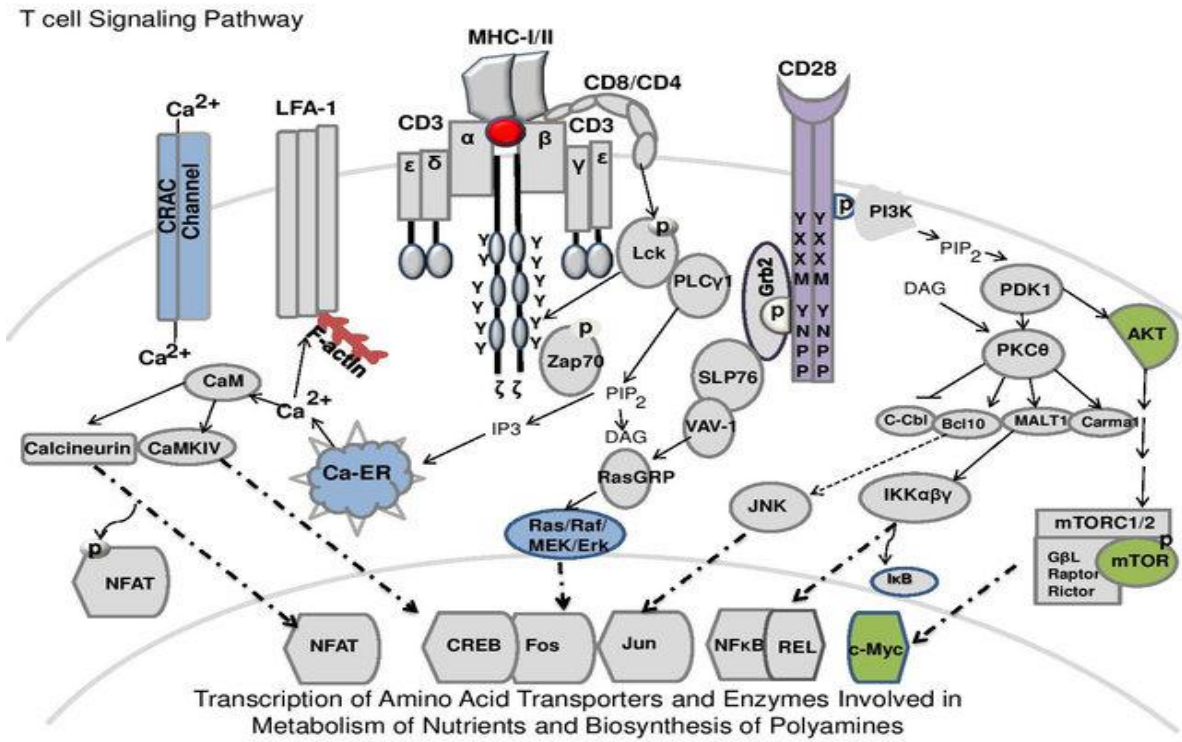


Module : CVSC (Communication et Voies de Signalisation Cellulaire)
Mutagenèse



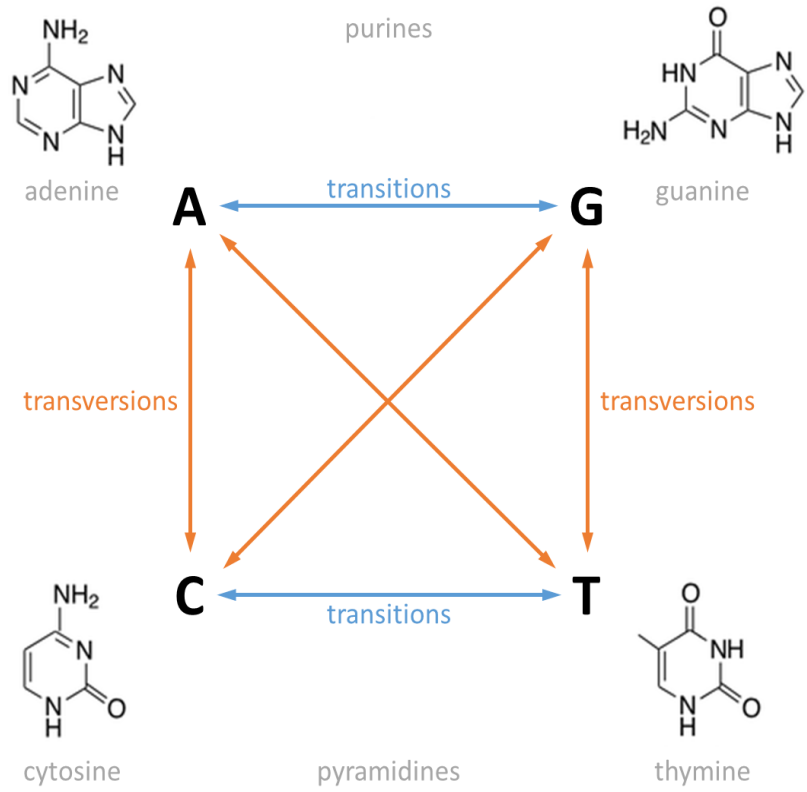
1-Mutagenèse aléatoire :

La reconnaissance de la séquence n'est pas requise

Types d'altérations :

➤ Mutations ponctuelles

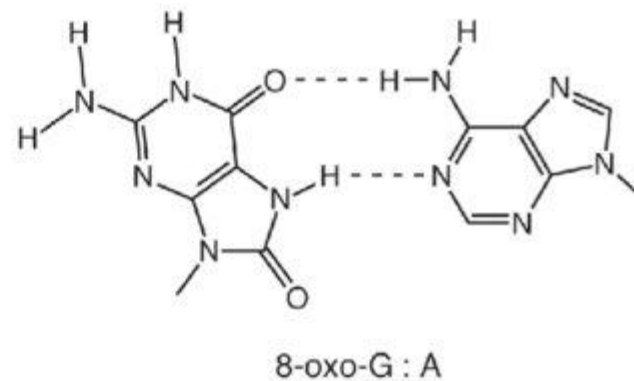
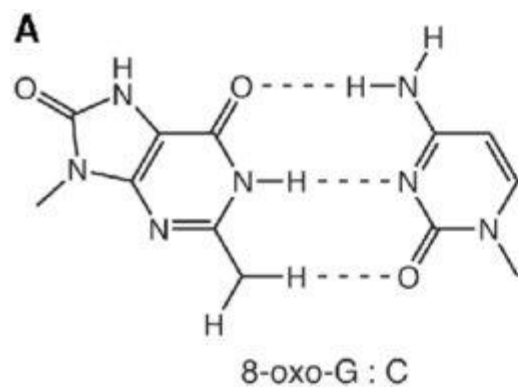
➤ Insertion et délétion de nucléotides



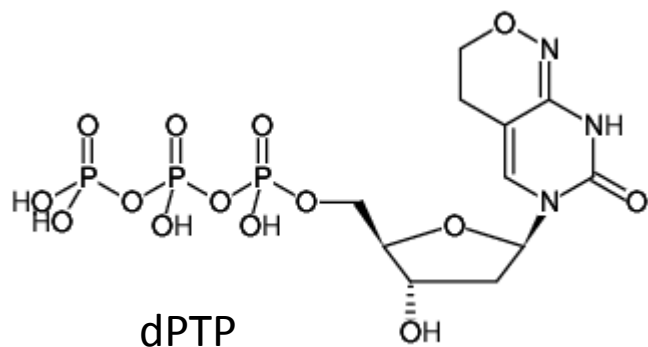
Agents mutagènes :

- 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

Analogues de dNTP :



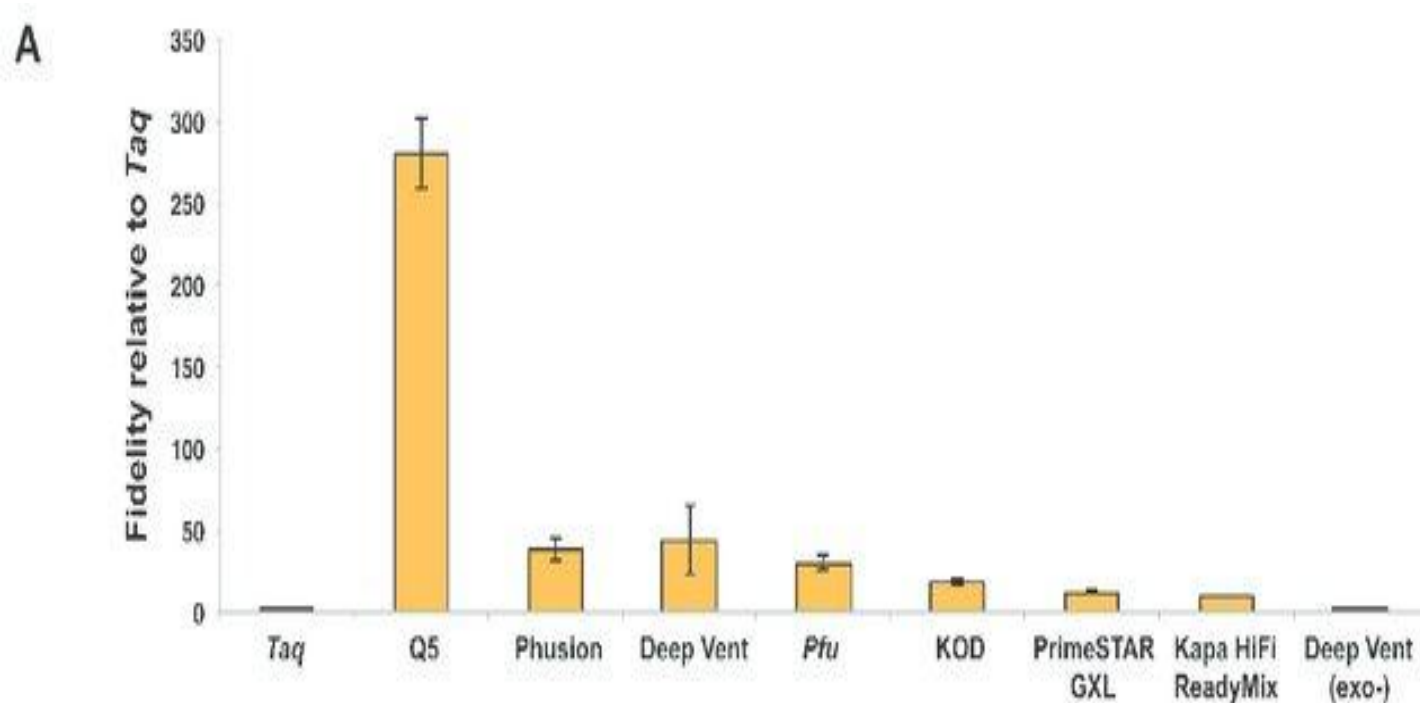
Misappariement avec A et C



- 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

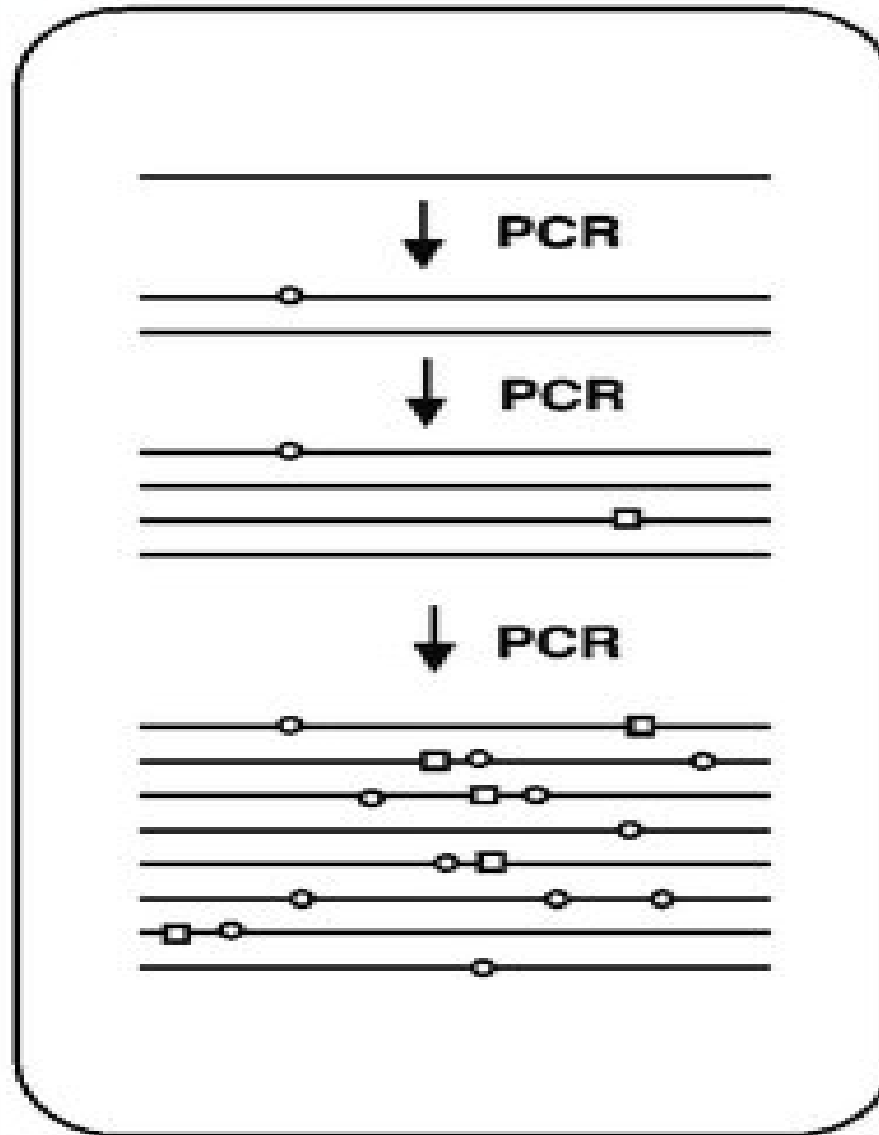
La Taq polymérase :



Mesures de fidélité et spectre de mutation des ADN polymérases.

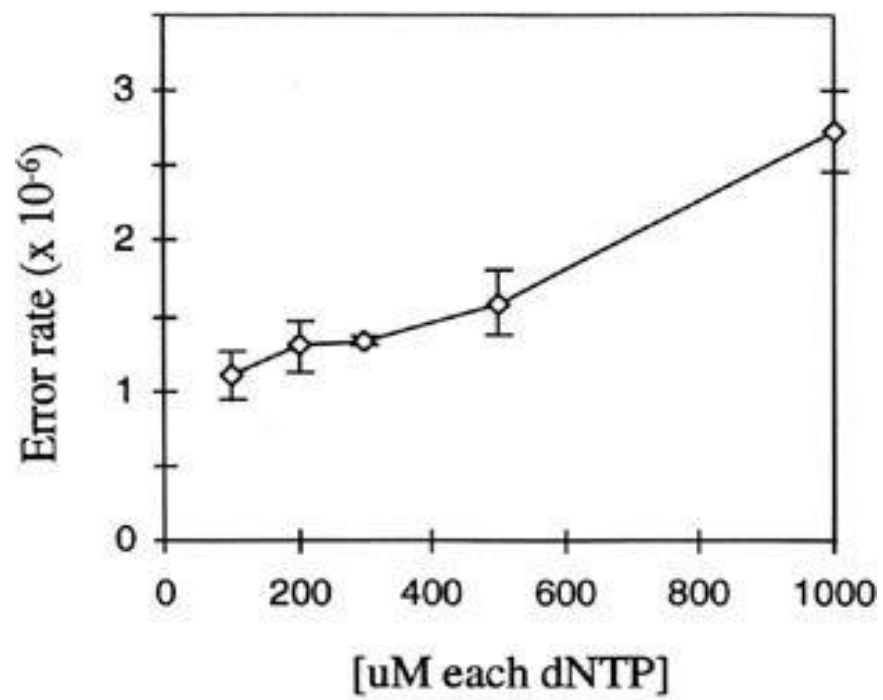
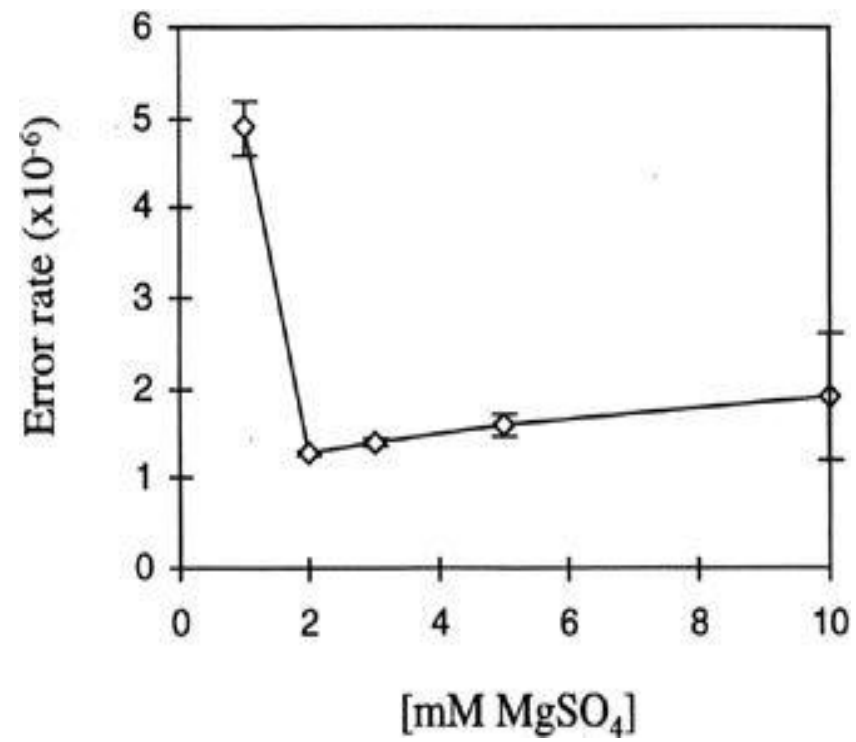
La Taq constitue l'outil de choix pour l'introduction des mutations (pas de proof-reading)

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.

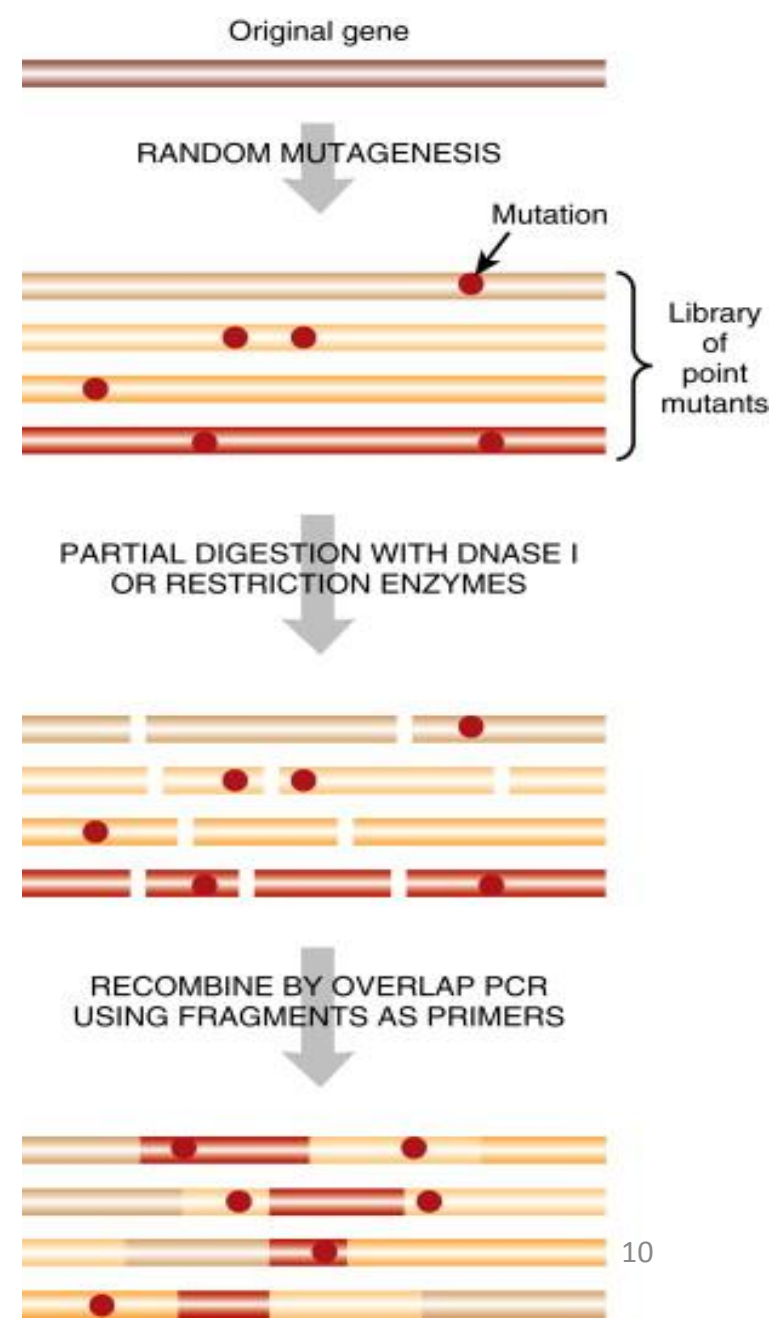
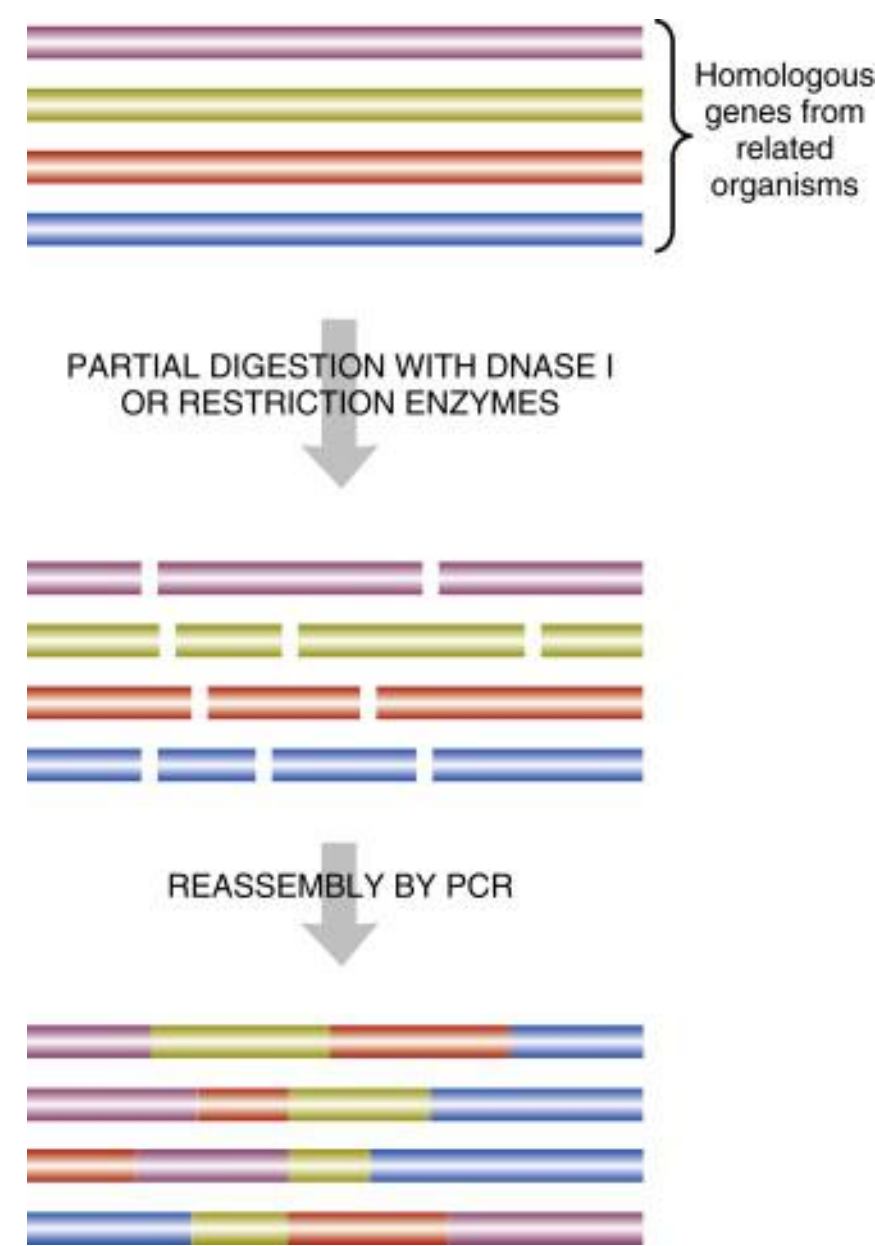
Exemple de Epr PCR :

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*) :



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.

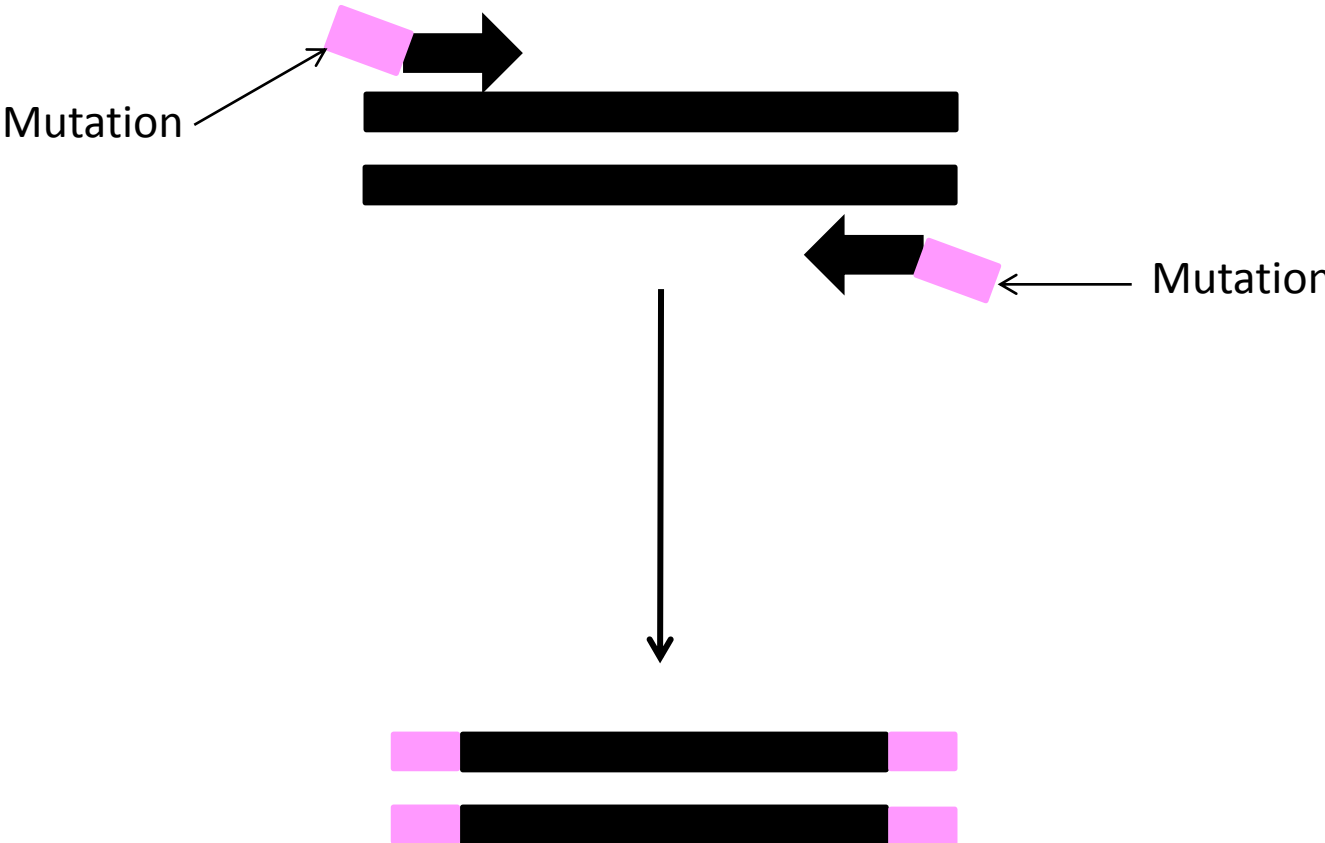
Amorce mutée :

- 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.

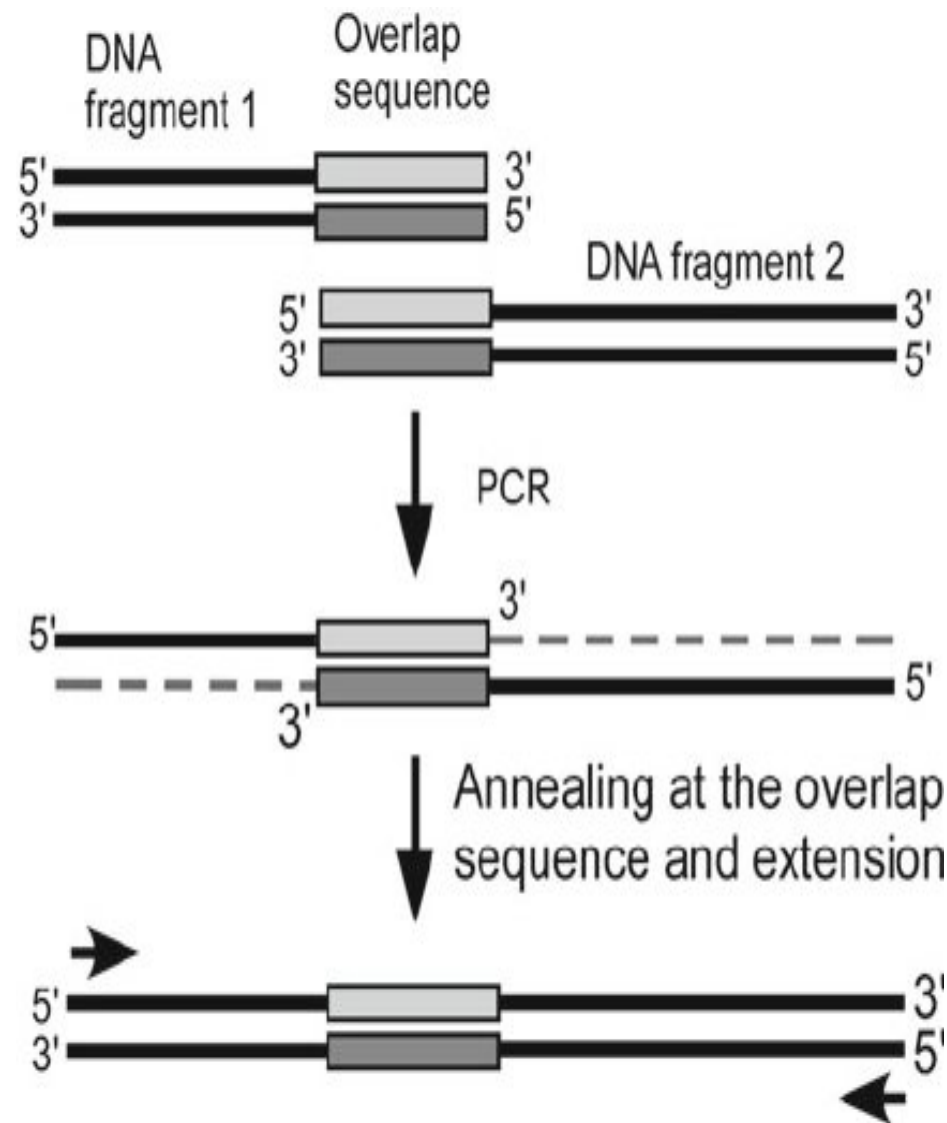


Amorce mutée

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 :

