

UE : GENE 2208

Responsable de l'UE (Unité d'Enseignement) :
Dr N'NAN ALLA

Enseignant : ECUE 1

Dr COULIBALY Fougoutin Hamidou
Expert auprès des Tribunaux (Test d'ADN, Génétique)

Spécialités : *Génétique Humaine*
Biologie de la Procréation
Cytogénétique
Spermiologie
Essais Cliniques

Site web : www.crieafrique.net
E-mail : info@crieafrique.net

Enseignant : ECUE 2

Dr N'NAN Oulo
Maître-Assistant Génétique

Spécialités : *Biotechnologie et Conservation des*
Ressources Génétiques

I- Extraction et purification des acides nucléiques

A- Extraction de l'ADN

- 1- A partir des tissus
- 2- A partir du sang

B- Extraction des ARN

- 1- ARN totaux
- 2 – Purification des ARNm à partir des ARN totaux

C- Dosage et conservation des acides nucléiques

- 1- Estimation des quantités d'ADN
 - a- Méthode basée sur la fluorescence
 - b- Méthode basée sur le spectrophotomètre
- 2- Conservation des acides nucléiques

II- Les enzymes agissant sur les acides nucléiques

A- Les enzymes de restriction

- 1- Généralités
- 2- Séquences d'ADN reconnues par les enzymes de restriction
- 3- Origine des enzymes de restriction
- 4- Nomenclature des enzymes de restriction
- 5- Notion d'isoschizomères
- 6- Types de coupures réalisées par les enzymes de restriction
- 7- Méthylation des sites de restriction et inactivation des enzymes
- 8- Notion d'enzymes compatibles
- 9- Utilisation des enzymes de restriction

B- Les outils enzymatiques autres que les enzymes de restriction

- 1- Les enzymes coupant l'ADN
 - a- DNase
 - b- Nucléase S1
- 2- Les enzymes assurant la ligation
- 3- Les enzymes enlevant ou ajoutant des groupes phosphates
- 4- Les enzymes recopiant les acides nucléiques
 - a- Enzymes recopiant un ADN en un ADN
 - b- Enzymes recopiant un ARN en un ADN
 - c- Enzymes recopiant un ADN en un ARN

III Séparation des acides nucléiques

A- Electrophorèse

B- Ultracentrifugation

IV Détection, caractérisation et identification des acides nucléiques

A- Marquage et suivi des acides nucléiques

- 1- Marquage radioactif
 - a- Les sondes doubles brins
 - b- Les sondes simples brins
- 2- Marquage froid
 - a- Fluorescence

b- Colorimétrie

c- Chimiluminescence

B- Dénaturation et Hybridation moléculaire

1- Dénaturation de l'ADN

2- La renaturation ou hybridation

C- L'hybridation moléculaire avec la sonde

1- Southern blot

2- Northern blot

3- Dot blot

4- Hybridation in situ

5- Hybridation sur colonies

6- Hybridation sur chromosomes

V Amplification et sélection d'acides nucléiques particuliers

A- La PCR

B- La TRQCR

1-Extraction/Purification des acides nucléiques

L'ADN (ou l'ARN) doit impérativement être purifié à partir de matériels biologiques dans des conditions optimales de qualité et de quantité.

Le schéma général d'extraction de l'ADN se présente comme suit:

- 1- le broyage des tissus biologiques contenant l'ADN dans un tampon à pH neutre ou légèrement basique
- 2- la séparation de l'ADN d'avec les autres composés solubles (protéines, ARN, ...)
- 3- le dosage et la conservation de l'ADN

1.1 Extraction de l'ADN

Le procédé classique est l'extraction par le couple phénol-chloroforme. Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et il permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques. Il est ensuite éliminé par l'extraction avec du chloroforme (non miscible avec l'eau). La séparation des phases aqueuse et organique peut se faire par centrifugation. La phase aqueuse contient les acides nucléiques. Des traitements par des agents clivant les protéines (protéolyse) peuvent être nécessaires. Les acides nucléiques peuvent être finalement récupérés sous forme solide à la suite de précipitation par l'alcool éthylique ou par l'alcool isopropylique. De nombreux réactifs sont disponibles, prêts à l'emploi, ce qui permet de simplifier les opérations de purification. Il est possible d'extraire les acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques variés: cultures cellulaires, tissus divers etc... Les méthodes d'extraction doivent bien entendu être adaptées aux quantités disponibles de matériel biologique.

1-1-1 Extraction de l'ADN à partir de tissus

Le broyage des tissus se fait dans des mortiers en céramique pour les tissus à membrane cellulosique (comme les tissus végétaux) et dans des tubes appropriés pour les cellules animales ou micro organiques. Dans certains cas, on peut utiliser des broyeurs ou mixers adaptés. Le broyage se fait en général, directement dans le tampon d'extraction. Cependant, l'écrasement des tissus dans l'azote liquide avant de les suspendre dans le tampon d'extraction (surtout pour les tissus végétaux ou les tissus durs des animaux) permet de mettre les tissus sous forme de poudre et améliore ainsi le taux d'extraction et la qualité de l'ADN extrait. Le broyage des tissus lyophilisés se fait à sec avant de suspendre la poudre dans le tampon d'extraction et peut avoir les mêmes avantages que l'utilisation de l'azote liquide si le dessèchement des tissus se fait rapidement. Le tampon d'extraction doit permettre de solubiliser les différents composants cellulaires en protégeant l'ADN contre les nucléases (enzymes). Ce tampon contient au minimum, un chélateur d'ions empêchant l'action des nucléases (EDTA) et du sel pour maintenir la structure de l'ADN. On peut y rajouter un détergent qui lyse les parois cellulaires (surtout pour les bactéries et les cellules animales) et d'autres composés pour améliorer la qualité et la quantité des acides nucléiques à extraire.

1-1-2 Extraction d'ADN à partir du sang

Faire éclater les globules rouges du sang par choc osmotique en le mélangeant à une solution hypotonique. Récupérer des globules blancs par centrifugation. Ajouter un mélange de détergent (SDS ou Sarcosyl) et de protéinase K ; le détergent détruira les membranes et la protéinase digérera les protéines associées à l'ADN. Extraire l'ADN des protéines par un mélange phénol-chloroforme. Ajouter des sels pour augmenter la force ionique puis précipitation de l'ADN par l'alcool éthylique absolu froid (-20°C).

L'ADN précipite sous forme de filaments, visibles à l'œil nu, qui sont récupérés par enroulement sur une baguette de verre. Re-dissoudre l'ADN dans une solution tamponnée. L'ADN peut être ainsi conservée à 4°C plus d'un an.

Remarque : la taille des fragments engendrés par les cassures mécaniques au cours de cette extraction est supérieure à 20kb. Le rendement de cette méthode est de quelques centaines de microgrammes d'ADN pour 10 à 20 ml de sang. Attention : éviter de congeler l'ADN génomique, la congélation provoquant de nombreuses cassures de la molécule.

1.2 Extraction des ARN

La stricte stérilité est recommandée à cause des RNases. Les milieux (eaux, tampons, ...) et les matériels d'extraction doivent être autoclavés sous haute pression. Les instruments ou matériels qui ne peuvent pas subir un tel traitement doivent être lavés à l'acide iodoacétique 10 mM ou à l'eau oxygénée puis rincées à l'eau autoclavée. Porter des gants durant toute la manipulation car les sécrétions humaines (sueur surtout) contiennent des RNases.

1-2-1 Extraction des ARN totaux

La méthode la plus sûre est la méthode de Chirgwin. Broyer le tissu dans un homogénéisateur de Potter avec une solution adéquate (détergent SDS ou Sarcosyl + un agent dissociant + une solution tampon + un agent réducteur). Centrifuger l'homogénat pour éliminer les débris cellulaires.

L'extraction des ARN se fait : soit par précipitation différentielle de l'ARN et de l'ADN / soit par ultracentrifugation sur coussin de chlorure de césium (seul l'ARN peut, vue sa densité, traverser ce coussin et être récupéré dans le culot

Laver l'ARN dans l'acétate de sodium et précipiter à l'alcool.

L'ADN est plus lourd que l'ARN.

1-2-2 Purification des ARNm à partir de ARN totaux

La majorité des ARNm eucaryotes possèdent une queue polyadénylée (polyA) à son extrémité 3', utilisée pour purifier les ARNm par affinité.

Passer la solution d'ARN sur une colonne d'affinité dont les sites de fixation sont des oligonucléotides polydT ou polyU. Les ARN polyA sont retenus alors que les ARNt et ARNr ne le sont pas. Eluer les ARNm et les récupérer par précipitation par l'alcool éthylique absolu froid. On obtient ~50% d'ARN non polyA. Pour enrichir en ARN polyA, repasser sur la colonne.

1-3 Dosage et conservation des acides nucléiques

1-3-1 Estimation des quantités d'ADN.

Cette estimation est indispensable après extraction d'ADN à partir d'un matériel biologique.

On a deux méthodes pour le dosage.

1-3-1-1 Méthode basée sur la fluorescence

Le principe est un fluorochrome qui se fixe sur le DNA et dont le taux de fixation est directement lié à la quantité de DNA émettra une quantité de fluorescence qui sera proportionnelle à la quantité de DNA présente.

- ◆ Les différents fluorochromes:

Se fixant spécifiquement sur des paires de bases:

Bases A-T: Hoechst 332 et DAPI

Bases G-C: mithramycine

- ◆ Intercalants: Iodure de propidium, Bromure d'ethidium et Acridine orange (qui ont l'avantage d'être moins chers)

Cette méthode nécessite un logiciel.

1-3-1-2 Méthode basée sur la spectrophotométrie

Le dosage s'effectue par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 260 nm. Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260 nm. Une unité de densité optique correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50 µg/ml ou à l'absorption d'une solution d'ADN simple brin (ou d'ARN) à la concentration de 40 µg/ml. Pour attester de la qualité de l'ADN, il faut mesurer le ratio A260/A280. Ce ratio doit être compris entre 1.8 et 2 pour considérer que l'ADN est pur

1-3-2 Conservation des Acides nucléiques

Le stockage des acides nucléiques se fait au froid :

Pour un stockage à court terme, l'ADN est gardé à +4°C

Pour un stockage à long terme, l'ADN est placé à -20°C

L'ARN peut être conservé plus d'un an soit sous forme précipitée dans l'éthanol, soit sous forme congelée à -80°C .

2 Les enzymes agissant sur les acides nucléiques

Les enzymes sont des protéines qui ont une activité catalytique. Cette activité requiert des conditions spécifiques de température.

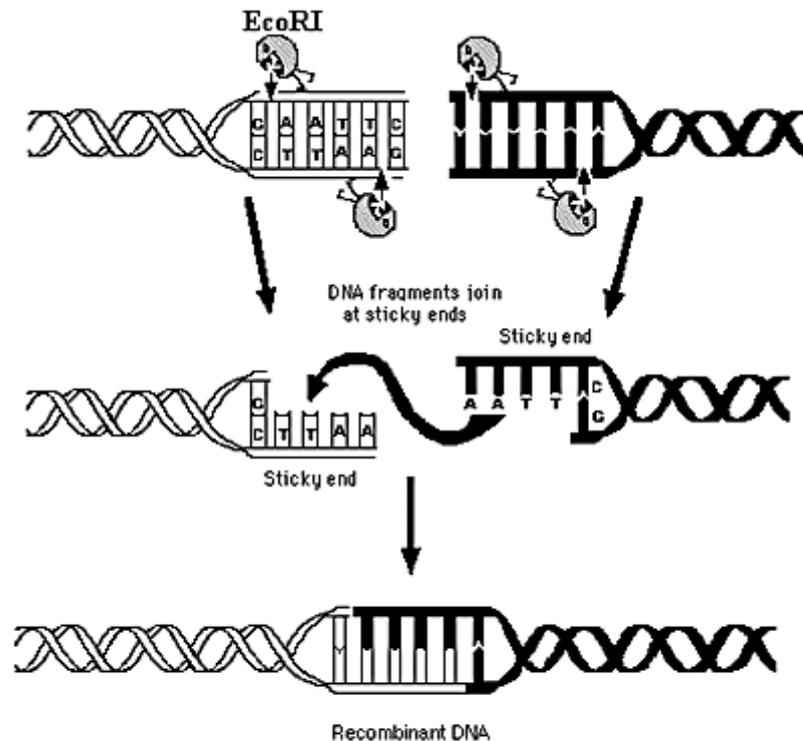
2-1 Les enzymes de restriction

2-1-1 Généralités

Découvertes à partir de 1973. Les enzymes de restriction sont capables de reconnaître spécifiquement une courte séquence (séquence palindromique), de 4 à 10pb, et de cliver l'ADN au site reconnu. Ils permettent de fragmenter l'ADN en segments de taille réduite, **ou de le couper à tel ou tel site désiré.** Certains enzymes coupent le site en son milieu et produisent deux fragments dont les extrémités sont franches. Cependant, la plupart réalisent une coupure dissymétrique : on parle dans ce cas d'extrémités cohésives (chaque fragment possède une chaîne qui dépasse l'autre de quelques bases). **Plusieurs centaines de ces enzymes ont été caractérisés : ils reconnaissent une grande variété de sites de coupure.** Les enzymes de restriction sont utilisés pour établir une carte de restriction de toute molécule d'ADN que l'on souhaite caractériser. Cela consiste à déterminer l'ordre des sites de restriction le long de cette molécule, qui vont produire, après "digestion enzymatique" de cette molécule, des fragments de tailles différentes dont la taille pourra être définie par électrophorèse.

Les enzymes de restriction appartiennent à la classe des endonucléases, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique. Les endonucléases se différencient des exonucléases qui dégradent la molécule d'ADN à partir de l'une de ses extrémités (3' ou 5').

Variété de sites de coupure



Restriction Enzyme Action of EcoRI

2-1-2 Séquences d'ADN reconnues par les enzymes de restriction.

Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des séquences dites palindromiques. Les séquences palindromiques sont des séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5' à 3' (gauche-droite) pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens droite-gauche pour le second brin (sens 5' à 3'). Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4, 5 ou 6 paires de bases. Dans les ADN, on rencontre statistiquement des séquences reconnues par des enzymes de restriction. Ainsi, la séquence GATC reconnue par l'enzyme Mbo I est présente avec une fréquence statistique de $1 / 256$ paires de bases ($1 / 4^4$). En effet, la fréquence de coupure d'un ADN par une enzyme de restriction donnée peut être approchée statistiquement en considérant le nombre de nucléotides de la séquence spécifique reconnue par l'enzyme. Ainsi, par exemple, dans la séquence de six nucléotides: GGATCC reconnue par l'enzyme Bam HI, on aura donc une fréquence de coupure statistique de $1 / 4^6$, soit 1 coupure tous les 4096 nucléotides.

2-1-3 Origine des enzymes de restriction.

Les enzymes de restriction sont extraites de micro-organismes, le plus souvent des bactéries. Les bactéries fabriquent des enzymes de restriction qui sont capables de cliver les ADN étrangers. Les bactéries peuvent être parasitées par des virus à ADN. Pour éviter une auto-destruction de leur propre ADN, elles se protègent contre leurs

propres enzymes de restriction par une modification des sites de restriction correspondants par methylation.

2-1-4 Nomenclature des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction présentent une nomenclature bien précise. Leur nom comporte plusieurs lettres (3 ou 4). La première lettre de dénomination de l'enzyme est écrite en majuscule, elle correspond au genre de la bactérie d'où a été extraite l'enzyme. La seconde lettre et la troisième lettre (en minuscules) correspondent à l'espèce de la bactérie d'où l'enzyme est extraite. On peut avoir une quatrième lettre écrite en majuscule correspondant à la souche bactérienne. Enfin pour terminer, un chiffre romain indique l'ordre de caractérisation de ces enzymes.

Exemples:

Eco RI Extraite de *Escherichia coli* RYB site reconnu: G / AATTC

Sma I Extraite de *Serratia marcescens* site reconnu: CCC / GGG

Pst I Extraite de *Providencia stuartii* site reconnu: CTGCA / G

2-1-5 Types de coupures réalisées par les enzymes de restriction.

Les enzymes de restriction peuvent donner deux types de coupures: la coupure à bouts francs et la coupure à bouts cohésifs.

La coupure à bouts francs aboutit à une coupure au milieu de la séquence palindromique. La coupure à bouts cohésifs (ou à extrémités adhésives) correspond à une coupure qui se fait de part et d'autre du centre de symétrie.

Les sites de restriction sont repérés dans l'ADN par l'enzyme de restriction qui coupe l'ADN en principe autant de fois qu'il y a de sites de restriction.

2-1-6 Notion d'isoschizomères

Des enzymes de restriction différentes peuvent reconnaître des mêmes sites spécifiques, on les appelle isoschizomères. Les isoschizomères fournissent souvent après clivage enzymatique des fragments dont les extrémités sont différentes.

Exemple :

Soit la séquence suivante: GGTACC, cette séquence est coupée par l'enzyme Kpn I et l'enzyme Acc65 I:

Kpn I:

5'-G-G-T-A-C/C-3'

3'-C/ C-A-T-G-G-5'

Acc65 I:

5'-G/G-T-A-C-C-3'

3'-C-C-A-T-G/G-5'

Ces enzymes sont des isoschizomères, elles reconnaissent en effet la même séquence nucléotidique GGTACC. On voit tout de suite que les extrémités des fragments obtenus diffèrent.

2-1-7 Notion d'enzymes compatibles

Deux enzymes de restriction sont dites compatibles quand elles génèrent après digestion des fractions aux extrémités cohésives complémentaires. Ces fragments peuvent être facilement ligaturés.

Exemple: Les enzymes Bam HI (G / GATCC) et Mbo I (/ GATC):

Après action de Bam HI:

Premier fragment avant clivage par Bam HI:	Après clivage par Bam HI:
5'-G-G-A-T-C-C-3'	5'-G-3' (1)
3'-C-C-T-A-G-G-5'	3'-C-C-T-A-G-5'
	+
	5'-G-A-T-C-C-3' (2)
	3'-G-5'

Après action de Mbo I:

Second fragment avant clivage par Mbo I:	Après clivage par Mbo I
5'-A-G-A-T-C-A-G-C-3'	5'-A-3' (3)
3'-T-C-T-A-G-T-C-G-5'	3'-T-C-T-A-G-5'
	+
	5'-G-A-T-C-A-G-C-3' (4)
	3'-T-C-G-5'

Ligatures possibles : 1+4 et 2+3.

2-1-8 Méthylation des sites de restriction et inactivation des enzymes de restriction

L'ADN bactérien présente des sites de restriction susceptibles d'être repérés par les enzymes de restriction de la bactérie. Pour éviter une auto-destruction, les enzymes de modification de l'ADN bactérien interviennent. Ces enzymes de modification sont des méthylases bactériennes (ou enzymes de méthylation). La méthylation de la cytosine (sur le carbone 5) ou de l'adénine (sur l'azote 6) appartenant à des sites de restriction aboutit à une inactivation de l'enzyme de restriction correspondante. Cette méthylation peut se réaliser sur une base ou sur plusieurs bases appartenant au site de restriction. Les méthylases bactériennes sont très spécifiques.

2-1-9 Utilisations des enzymes de restriction.

Les utilisations des enzymes de restriction sont très nombreuses en biologie moléculaire.

- Par exemple, elles permettent de fractionner l'ADN en multiples fragments susceptibles d'être séparés par les techniques d'électrophorèse.
- Les enzymes de restriction peuvent être utilisées pour préparer un fragment d'ADN d'un gène donné (insert) à être inséré dans un vecteur comme un plasmide.
- Les enzymes de restriction sont utilisées couramment pour rechercher des mutations dans le génome.
- Les enzymes de restriction sont utilisées pour rechercher dans l'ADN des cellules eucaryotes les méthylations de bases.

2-2 Les outils enzymatiques autres que les enzymes de restriction

2-2-1 Les enzymes coupant l'ADN.

◆ La DNase

La DNase est une endonucléase qui coupe l'ADN double brin (mais aussi l'ADN simple brin). Elle conduit à des coupures ou « nicks » tout à fait au hasard, sans reconnaissance d'un site spécifique (ce qui la distingue des enzymes de restriction). On obtient des fragments de tailles variées (ou oligonucléotides) qui possèdent en leur extrémité 5' un groupement phosphate. Cette enzyme est sensible à des ions bivalents (Mg^{2+} et Mn^{2+}). Elle est utilisée pour des [marquages de sondes avec des radioisotopes](#).

La nucléase S1

Cette enzyme extraite d'un champignon, n'attaque que l'ADN simple brin. Elle n'attaque pas en principe les ADN doubles brins et les hybrides ADN-ARN.

2-2-2 Les enzymes assurant la ligature.

◆ Les ligases

Les ligases sont capables de lier par une liaison ester (phosphodister) un fragment avec un groupement phosphate en 5' et un groupement OH en 3' et ceci en présence d'ATP. Elles peuvent effectuer des ligatures sur des fragments d'ADN avec bouts francs ou des bouts collants (ou extrémités cohésives). Elles sont extraites de bactéries. Il existe ADN et ARN ligases.

2-2-3 Les enzymes enlevant ou ajoutant des groupes phosphates

◆ Enzymes enlevant des groupes phosphates

Ces enzymes sont appelées phosphatases. Les phosphatases alcalines sont actives à pH alcalin. Elles permettent d'enlever le groupement phosphate situé en 5' d'une chaîne

d'ADN. Elles sont extraites de bactéries ou d'origine animale (intestins). Elles sont utilisées pour préparer de l'ADN recombinant.

◆ **Enzymes ajoutant des groupements phosphates**

Les kinases permettent de fixer un groupement phosphate en présence d'ATP. Dans cette molécule d'ATP, le phosphate fixé est celui situé en position gamma (position la plus externe) de la molécule d'ATP. Le groupement phosphate est fixé à l'extrémité 5' d'un ADN préalablement déphosphorylé. Ces kinases sont extraites de bactéries.

2-2-4 Les enzymes recopiant les acides nucléiques

◆ **Les enzymes recopiant un ADN en un ADN**

Ces enzymes sont des ADN polymérases ADN dépendantes. Elles ne sont pas capables de synthétiser le brin nouveau d'ADN sans la présence d'une amorce d'acide nucléique.

Toutes les ADN polymérases possèdent les caractéristiques suivantes:

- Elles ont besoin d'une amorce avec une extrémité 3'-OH libre.
- La chaîne nouvelle d'ADN est synthétisée dans le sens 5' à 3'.
- La chaîne nouvelle est complémentaire de la chaîne matrice d'ADN et antiparallèle.

Exemple 1 L'ADN polymérase I (extraite de E. Coli) et le fragment de klenow

Comme exemple-type d'ADN polymérase, nous citerons l'ADN polymérase I qui est extraite d'*E. coli*. Cette enzyme possède des propriétés polymérasiques, mais aussi des propriétés exonucléasiques. (Il est important de préciser que les exonucléases peuvent couper les nucléotides un par un à partir d'une chaîne polynucléotidique avec une spécificité soit de l'extrémité 5' (coupure 5' à 3'), soit de l'extrémité 3' (coupure 3' à 5')). L'ADN polymérase I possède les deux activités exonucléasiques: 5' à 3' et 3' à 5'. Cette enzyme est constituée par une seule chaîne polypeptidique.

Au laboratoire, on utilise souvent une enzyme préparée à partir de l'ADN polymérase I qui est appelée fragment de KLENOW. Cette enzyme ne possède plus d'activité exonucléasique 5' à 3', il reste les propriétés polymérasiques et les propriétés exonucléasiques 3' à 5'. L'activité 3' à 5' permet à l'enzyme au cours d'une synthèse d'un fragment d'ADN de contrôler si l'appariement de la base qui vient d'être ajoutée est conforme aux règles de complémentarité. Cette remarquable activité exonucléasique 3' à 5' est encore appelée la fonction d'édition de l'enzyme.

Exemple 2 La séquenase

Cette enzyme est d'origine bactérienne mais elle ne possède plus d'activité 3' à 5'. Elle est utilisée dans le séquençage de l'ADN.

Exemple 3 La Taq polymérase

La Taq polymérase est une ADN polymérase extraite de bactéries présentes dans les sources chaudes. Elle permet de travailler à des températures plus élevées que les températures usuelles (ambiante ou 37°C) c'est-à-dire à 72°C. Elle est très utilisée dans les réactions d'amplification génique et également dans les réactions de séquençage de l'ADN. En principe, elle est dépourvue de l'activité exonucléasique 3' à 5'.

◆ Les enzymes recopiant un ARN en un ADN

Exemple1 la rétrotranscriptase ou transcriptase inverse

Cette enzyme est surtout présente dans les rétrovirus (virus à ARN). Elle permet de fabriquer à partir d'un ARN messager (mARN) un ADNc (ou séquence d'ADN complémentaire d'un mARN).

Elle possède les propriétés suivantes:

- C'est une ADN polymérase qui synthétise le nouveau fragment dans le sens 5' à 3'.
- Elle est ARN-dépendante.
- Elle est dépourvue d'activité exonucléasique 3' à 5', donc de fonction d'édition. Elle peut donc insérer des bases par erreur.
- Elle a une activité RNase.

La technique classique pour préparer un [ADNc](#) à partir d'un mARN consiste tout d'abord à fournir une amorce à la rétrotranscriptase. Cette amorce peut être une séquence courte par exemple une séquence oligo(dT) capable de s'hybrider avec l'extrémité poly(A) du mARN. A partir de cette amorce, la rétrotranscriptase poursuit la copie en ADN du mARN (élongation). De plus à la fin de la copie, elle est capable de recopier son propre travail, donc elle réalise une boucle à l'extrémité 3' de l'ADN copié. Un traitement chimique doux permet de détruire le mARN simple brin mais pas sa copie d'ADN simple brin. On ajoute ensuite de l'ADN polymérase pour réaliser une copie de l'ADN simple en ADN double brin. La nucléase S1 peut ensuite éliminer l'extrémité de l'épingle à cheveu. On a ainsi formé un ADNc double brin. D'autres techniques existent pour préparer du ADNc à partir du mARN.

◆ Les enzymes recopiant un ADN en un ARN

Les ARN polymérases réalisent des transcriptions de l'un des deux brins d'ADN en un brin d'ARN. Elles sont extraites des bactéries. Ces ARN polymérases possèdent les propriétés suivantes:

- Elles synthétisent le brin nouveau dans le sens 5' à 3'.
- Elles n'ont pas besoin d'amorce pour commencer la synthèse (à la différence des ADN polymérases).
- Elles nécessitent des ribonucléosides triphosphates (ou NTPs) et également (comme les autres polymérases) des ions Mg^{2+} .
- Elles sont dénuées d'activité d'édition.
- Enfin, dans des conditions normales de transcription, les ARN polymérases ne peuvent démarrer la transcription que si l'ADN à transcrire possède le promoteur spécifique correspondant.

3 Séparation des acides nucléiques

Après avoir quantifiés et digérés, les différents fragments doivent être séparés

3-1 Electrophorèse

Technique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique. On peut ainsi analyser et purifier dans un milieu gélifié (gel d'agarose, gel de polyacrylamide...) l'ADN, l'ARN, les protéines.

Migration électrophorétique des fragments d'ADN.

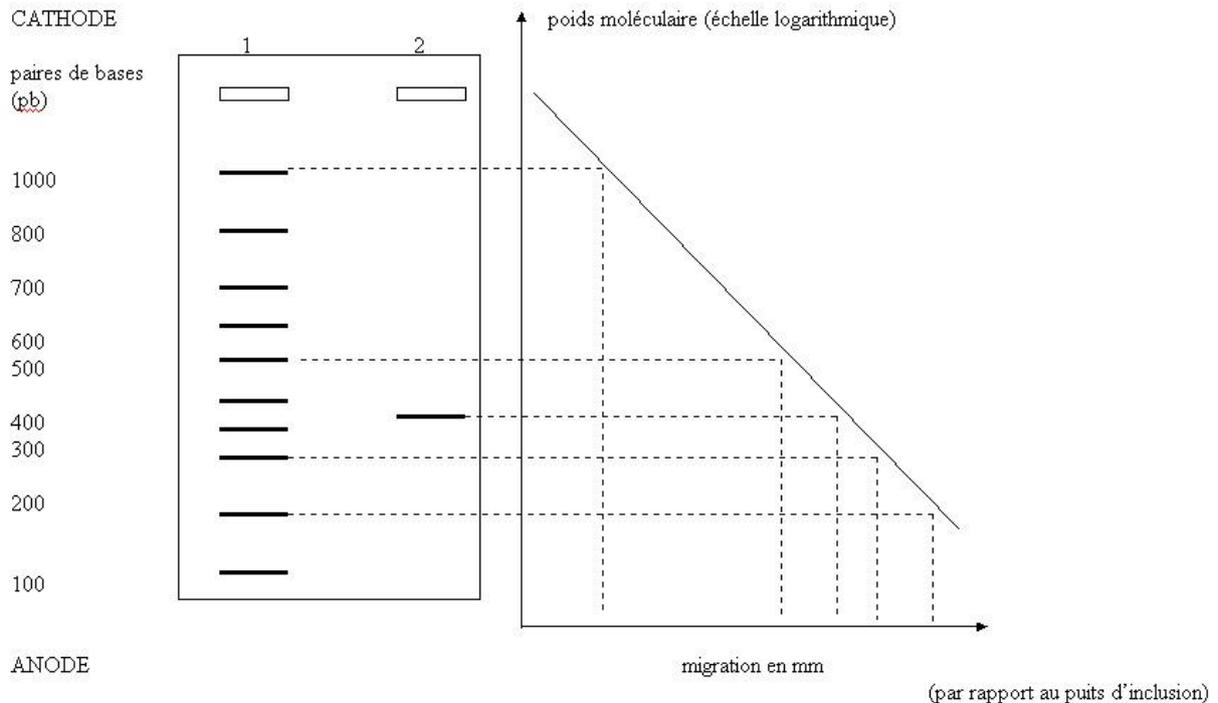
Les fragments d'ADN après digestion par les enzymes de restriction peuvent être séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Dans ce type de gel, les migrations des fragments d'ADN dépendent de la taille du fragment plus que de la charge de celui-ci. Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion sera importante. A l'opposé les fragments de petite taille auront une distance de migration la plus élevée. La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse est effectuée en faisant migrer des marqueurs de poids moléculaire en parallèle avec les échantillons à analyser. La détection de l'ADN sur ce type de gel est réalisée par exposition aux rayons UV après réaction avec un réactif spécifique (bromure d'éthidium par exemple, agent s'intercalant entre les brins d'ADN).

L'électrophorèse des fragments d'ADN en gel d'agarose permet des séparations jusqu'à 20-25 kb (20000-25000 pb). Le tampon utilisé pour la migration électrophorétique a un pH basique (par exemple: 8,3 dans le cas du tampon appelé TBE = Tris-Borate-EDTA).

Des fragments d'ADN de taille restreinte (inférieure à 1000 paires de bases) peuvent être séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

(D'autres techniques électrophorétiques existent comme l'électrophorèse en champ pulsé qui permet de séparer des grands fragments d'ADN (taille supérieure à 50 kb). Le support d'électrophorèse est constitué par de l'agarose et on applique au gel un champ électrique de nature variable. Ainsi, le champ électrique peut être appliqué dans une direction donnée pendant 1 minute puis dans une direction perpendiculaire au champ précédent pendant une minute et ainsi de suite. Le processus de réorientation des macromolécules dans le champ électrique dépend de leur taille.

Illustration d'une électrophorèse en gel d'agarose après migration et coloration par le bromure d'éthidium.)



Légendes des figures :

FIGURE DE GAUCHE

- PISTE 1: Marqueurs de taille (en paires de bases).
- PISTE 2: Echantillon d'ADN dont la taille est à déterminer.

FIGURE DE DROITE

- Courbe d'étalonnage en abscisses, les distances par rapport au puits d'inclusion: et en ordonnées les poids moléculaires (échelle logarithmique).

3-2 Ultracentrifugation

La centrifugation est une technique de séparation rapide des particules basée sur la densité. Elle permet de séparer les particules solides (les plus lourdes) des substances en solution (moins lourdes) au dessus.

(Une suspension de macromolécules peut éventuellement laisser sédimenter celles-ci sous l'effet du champ de pesanteur. Cependant, l'agitation thermique met en œuvre des énergies bien supérieures à l'énergie potentielle de gravitation, pour une macromolécule se déplaçant sur quelques centimètres.)

Pour rendre possible la séparation, il faut travailler avec de très grandes accélérations. Ceci est possible avec des centrifugeuses ou ultracentrifugeuses. Ces appareils, sont composés des éléments suivants:

- (- un moteur capable de tourner à plusieurs dizaines de milliers de tours par minute
- un rotor, capable de supporter des rotations aussi rapides (en titane généralement pour les rotors des ultracentrifugeuses)
- une enceinte dans laquelle est disposé le rotor, qui est réfrigérée et sous vide. En effet, pour les vitesses de rotation les plus rapides, le déplacement des extrémités du rotor (diamètre de l'ordre de 20-40 cm) est supersonique. Ceci entraînerait un échauffement insupportable dans l'air.
- cette enceinte est de plus blindée pour éviter des accidents en cas d'explosion du rotor.

Cette technique de centrifugation a été mise au point par Svedberg (1923), qui l'utilisa pour déterminer des masses moléculaires. Elle fut appliquée à la biologie par le physiologiste belge Albert Claude (Prix Nobel 1974), qui isola grâce à elle les microsomes, c'est-à-dire ce qui reste de la cellule lorsque l'on sépare les mitochondries et les réticulums. A des vitesses de l'ordre de 20 000 tours/minute, il est possible de :

- séparer les constituants cellulaires (membranes/cytosol)
- séparer différents types A.D.N. (chromosomique et plasmidique) dans un gradient de chlorure de césium. La vitesse de déplacement des molécules est exprimée en Svedberg. $S=10^{-13}$ secondes.)

4 Détection, caractérisation et identification des acides nucléiques

4-1 Marquage et suivi des acides nucléiques

Le marquage est principalement employé dans toutes les techniques qui utilisent une [sonde](#) (hybridation, northern,). On distingue le marquage dit « chaud » utilisant des isotopes radioactifs, et les marquages « froids » qui utilisent des molécules aux propriétés fluorescentes, luminescentes. Ces dernières sont de plus en plus employées car plus pratiques.

4-1-1 Marquage radioactif

On distingue plusieurs méthodes selon la localisation du marquage (extrémités ou interne à la molécule) et selon la nature de la séquence marquée (simple ou double brin).

Le Phosphore 32 est le radioisotope le plus utilisé. Incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radiomarqués Il existe des sondes mono ou double brins Soufre 35, H 3 utilisés plutôt pour le séquençage et [hybridation in situ](#). On peut aussi réaliser un marquage en 5' : avec la T4 polynucléotide kinase. La radioactivité est aussi utile pour le marquage des oligonucléotides de synthèse.

4-1-1-1 Les sondes double brins

◆ Marquage par amorçage au hasard (Random Printing)

Très employé dans les laboratoires pour par exemple les [Southern](#) et [Northern Blot](#), il permet d'obtenir des activités spécifiques plus élevées, nécessaires pour détecter un gène sur quelques mG d'ADN génomique.

Dans cette technique de marquage, les deux brins d'ADN de la sonde sont préalablement séparés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal. Puis, on ajoute un mélange d'oligonucléotides (hexanucléotides) de synthèse correspondant à toutes les combinaisons mathématiquement possibles (soit $4^6 = 4096$ nucléotides). Ces oligonucléotides vont s'hybrider avec la sonde pour une partie d'entre eux. Ces oligonucléotides fixés vont servir d'amorces au fragment de Klenow de l'ADN

polymérase I qui va reconstituer l'intégrité des deux fragments en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au ^{32}P . Des ADN polymérases par exemple dérivée du phage T7 sont actuellement les plus utilisées.

◆ **Marquage en 3'** : marquage aux extrémités.

Il faut

*avec une **ADN** pol. : fragment de Klenow, T4 **ADN** pol., Taq pol., transcriptase reverse.

*avec une exonucléase

*avec une terminal transférase

L'ADN peut être marqué à son extrémité 5' à l'aide d'une kinase, par exemple, la T4 polynucléotide kinase extraite d'E. coli infecté par le bactériophage T4. En présence d'ATP avec du ^{32}P en position g ou [^{32}P]g-ATP, il est possible d'échanger le groupement 5'-phosphate présent sur le fragment d'ADN avec le phosphate radio-actif en position g sur l'ATP. Cette méthode est générale. Elle est plus efficace si les extrémités 5'- sont préalablement déphosphorylées, par exemple par l'action d'une phosphatase alcaline.

◆ **Marquage par translation de coupure (Nick Translation) : marquage à l'intérieur**

utilise deux enzymes :

*DNase I dans des conditions ménagées pour générer quelques coupures simple brin dans le fragment d'intérêt

*DNA pol.I pour dégrader l'**ADN** dans sens 5'-3' au niveau de ces coupures et repolymériser en présence d'un nucléotide chaud (radioactif).

L'ADN double brin traité par la Dnase I est clivé au hasard. La réparation des coupures réalisées par la Dnase I nécessite l'action de l'ADN polymérase I en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au phosphore radioactif (^{32}P). Les désoxynucléosides triphosphates utilisés sont marqués en position alpha au ^{32}P . Cette technique est appelée "technique de nick translation". Cette technique est actuellement en retrait par rapport à la technique suivante (le marquage froid).

4-1-1-2 Les sondes simple brin

◆ **d'ADN :**

*sondes à activité spécifique importante (Southern, Northern Blot)

*protection contre la nucléase S1, hybridation in situ. **Avantage** : ne se renature pas sur elle-même lors de l'hybridation.

◆ **d'ARN : ribosondes**

*rendements d'hybridation meilleurs par rapport aux hybrides **ADN-ADN**, plus stables

*pour hybridation in situ

*cartographie des ARN

Remarque : Les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients :

- nécessité de se protéger du rayonnement émis, un maniement des sondes inconfortables.
- Décroissance rapide du P32, d'où un besoin de marquer les sondes fréquemment. Pour pallier à ces inconvénients, on peut utiliser les sondes « froides ».

4-1-2 Marquages froids : fluorescence ; colorimétrie ; chimioluminescence

4-1-2-1 Fluorescence :

- ◆ Absorption d'énergie lumineuse par une molécule (fluorochrome)
- ◆ Passage à l'état de Molécule excitée
- ◆ Relaxation partielle avec perte de chaleur par échange avec le milieu ambiant
- ◆ Retour à l'état fondamental par émission lumineuse (de plus grande longueur d'onde que l'onde de stimulation) = spectre de fluorescence

4-1-2-2 Colorimétrie :

Colorants : biotine, digoxygénine, fluoresceine

Exemple : l'ADN cible est fixé sur une membrane et les sondes sont biotinylées. La détection est réalisée par ajout d'un complexe streptavidine-HRP (HorseRadish peroxidase ou Peroxydase de Raifort), l'enzyme permettant l'oxydation d'un chromogène. La mesure du signal est réalisée par colorimétrie

4-1-2-3 Chimioluminescence

La chimioluminescence se produit au cours d'une réaction chimique lorsque l'excès d'énergie est libéré sous forme de lumière.

De nombreuses réactions produisent ce phénomène et chacune émet une lumière de longueur d'onde spécifique, et d'intensité proportionnelle à la quantité de molécules réactives présentes.

Attention : ces sondes « froides » présentent un problème de sensibilité et leur utilisation ne fait pas toujours l'unanimité.

4-2 Dénaturation de l'ADN et Hybridation moléculaire

4-2-1 La dénaturation de l'ADN

L'augmentation lente de la température (jusqu'à 94°C) d'une solution d'ADN rompt les liaisons hydrogènes entre les bases et sépare les 2 brins: on parle de dénaturation. Elle peut être suivie par mesure de l'absorption de la lumière UV (densité optique) à 260 nm. L'ADN sous forme bicaténaire absorbe avec modération alors que la forme monocaténaire absorbe plus fortement (en raison du démasquage des bases).

La température qui provoque la dénaturation de la moitié des molécules d'ADN est appelée température de fusion ou T_m (melting temperature).

Il est possible de mesurer directement la température de fusion d'un ADN double brin en mesurant l'augmentation de l'absorbance de la solution à 260 nm en fonction de la température.

Toutefois, on se contente la plupart du temps d'une estimation à partir de la composition de l'oligonucléotide. Si celui-ci a une longueur égale ou inférieure à 20 nt on compte 2°C par couple A:T et 4°C par couple G:C.

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

A partir de $N = 20$, on corrige d'un multiplicateur proportionnel à la longueur au delà de ce chiffre : $1 + [(N-20)/20]$.

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) \times (1 + [(N-20)/20])$$

Pour être plus précis il faut tenir compte aussi de la concentration en sodium du tampon d'hybridation. Lorsque cette concentration n'excède pas 1M, on utilise la formule :

$$T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41[(G+C)/N] - (600/N)$$

Lorsqu'il existe des misappariements (*mismatches*) il faut soustraire de la T_m calculée autant de degrés C. que le pourcentage de séquence non-appariée de l'oligonucléotide.

Lorsqu'on travaille en présence de formamide, il faut encore diminuer la T_m en fonction de la concentration de l'amide

$$T'_m = T_m - 0,6(\% \text{ formamide})$$

4-2-2 La renaturation ou l'hybridation

Le refroidissement lent de la solution d'ADN dénaturé amène les brins complémentaires à se réassocier pour donner à nouveau une double hélice: c'est la renaturation ou l'hybridation. Cette réassociation peut aussi s'effectuer entre ADN et ARN donnant des hybrides ADN /ARN. L'hybridation moléculaire désigne donc l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou l'uracile U) et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G). La formation et la stabilité des duplex dépendent de nombreux facteurs en plus de la composition en bases : longueur des duplex, complexité de la séquence.

La composition de l'ADN et le temps: notion de Cot et de Rot

L'hybridation est un phénomène aléatoire conditionné par la fréquence des rencontres des molécules. Pour une température donnée, ces rencontres sont augmentées par l'élévation de

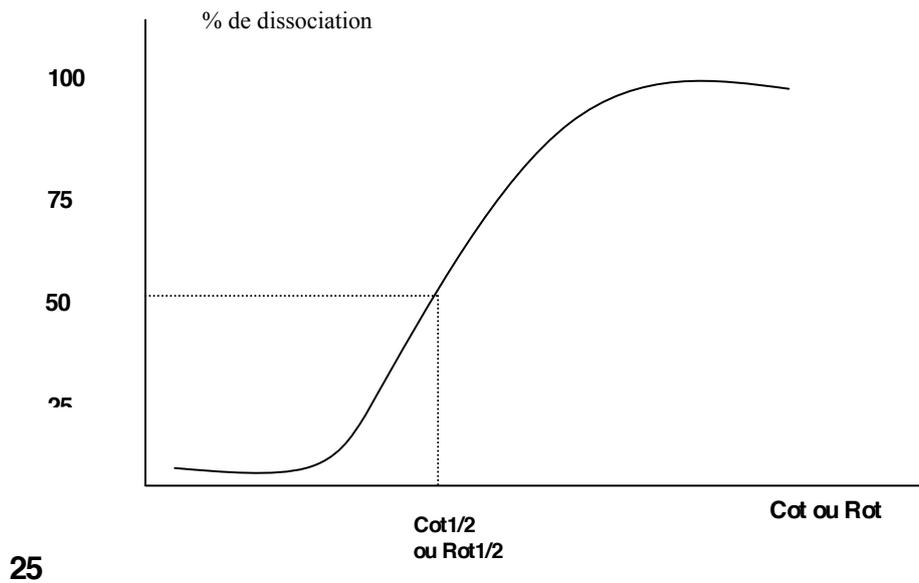


Fig : Détermination du Cot $_{1/2}$ ou Rot $_{1/2}$

la concentration des molécules interagissant et par la durée de l'expérience. En d'autres termes, plus la concentration d'ADN dans la solution est élevée et plus le temps de réaction est long, plus la probabilité que les séquences complémentaires s'hybrident est grande. L'hybridation est évaluée en fonction du produit de ces 2 variables. Ce produit est une variable notée Cot. Cot $\frac{1}{2}$ est la valeur permettant 50% d'hybridation.

On parle de Rot lorsqu'il s'agit d'hybridation d'ARN/ADN.

4-2-1 Les sondes nucléotidiques

4-2-1-1 Définition

Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Cette réaction sonde-fragment correspond à *une réaction d'hybridation moléculaire*.

4-2-1-2 Caractéristiques générales

Une sonde nucléotidique peut être soit une séquence d'ADN ou d'ARN, mais *obligatoirement monobrin*. Sa taille est très variable: oligonucléotide de 20 à 30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides. La sonde est complémentaire et antiparallèle du fragment recherché. Dans un mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage avec un radioisotope (marquage chaud), mais il existe également des sondes appelées sondes froides sans marquage par un radioisotope.

4-2-1-3 Obtention d'une sonde

Il existe plusieurs possibilités pour obtenir une sonde nucléotidique:

- Une sonde oligonucléotidique peut être fabriquée par synthèse chimique, si la séquence de l'ADN à repérer est connue. Si elle est inconnue, on peut étudier la protéine correspondante et remonter grâce au code génétique à la séquence d'ADN. Dans ce dernier cas, le travail est particulièrement laborieux (nombre de codons élevé pour un même acide aminé).
- Une sonde peut être un ADNc. Une partie seulement du ADNc est utilisée (après action d'enzymes de restriction et clonage des fragments obtenus).
- Une sonde peut être théoriquement du mARN.

4-3 L'hybridation moléculaire avec la sonde

L'hybridation moléculaire sonde-fragment d'ADN à repérer nécessite des conditions physico-chimiques parfaites (tampon, pH, température, etc..). Ces conditions sont appelées *la stringence*. Plusieurs facteurs peuvent également intervenir comme la longueur de la sonde et la complémentarité sonde-fragment avec possibilité de mauvais appariements.

4-3-1 Southern Blot

Cette méthode a été initialement décrite par E.M. SOUTHERN en 1975. Elle consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des séquences complémentaires marquées par un radioisotope. Les étapes successives de cette technique sont les suivantes:

- ◆ Extraction de l'ADN génomique.
- ◆ Digestion par des enzymes de restriction différentes du même ADN génomique.
L'ADN génomique est digéré par des enzymes de restriction différentes: dans le tube 1, on réalisera une digestion par l'enzyme 1; dans le tube 2, une digestion par l'enzyme 2; etc....). On peut bien entendu réaliser des digestions par deux enzymes dans un même tube. Dans ces conditions, on obtient un très grand nombre de fragments, mais seuls quelques fragments correspondent à une partie ou à la totalité du gène étudié.
- ◆ Séparation électrophorétique des fragments d'ADN par électrophorèse dans un gel d'agarose.
Après séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADN bicaténaires obtenus par digestion enzymatique, on réalise une dénaturation des fragments par un traitement alcalin du gel d'électrophorèse. Ce traitement transforme les fragments d'ADN double brin (ou bicaténaires) en fragments d'ADN monobrin (ou monocaténaires).
- ◆ Transfert des fragments monocaténaires du gel d'agarose à un support souple (feuille de nylon par exemple).
Le transfert des fragments monocaténaires du gel d'agarose à un support type nylon s'effectue par simple capillarité.

◆ Fixation des fragments monocaténaire d'ADN sur le support souple et hybridation dans des conditions optimales de stringence avec une sonde complémentaire marquée à un radioisotope.

Les fragments monocaténaire d'ADN transférés sur un support solide souple (nylon) sont mis en présence d'une sonde qui va s'hybrider dans des conditions physico-chimiques bien définies. On parle de conditions optimales de stringence. La sonde s'apparie avec les fragments d'ADN monocaténaire selon les règles de complémentarité. De plus, elle est marquée avec un radioisotope (soit à son extrémité 5', soit à l'intérieur de la chaîne polynucléotidique).

◆ Lavages et révélation (dans ce cas par autoradiographie).

Après de nombreux lavages, le support solide est mis en contact avec un film photographique pendant plusieurs jours. Le film est ensuite révéler. Les bandes d'ADN monocaténaire hybridées avec la sonde radioactive sont visibles sous forme de bandes noires sur un fond blanc. La position de ces bandes par rapport à des témoins de poids moléculaire permet de déterminer la taille de ces fragments.

[Nous citerons parmi les applications de la technique de SOUTHERN:](#)

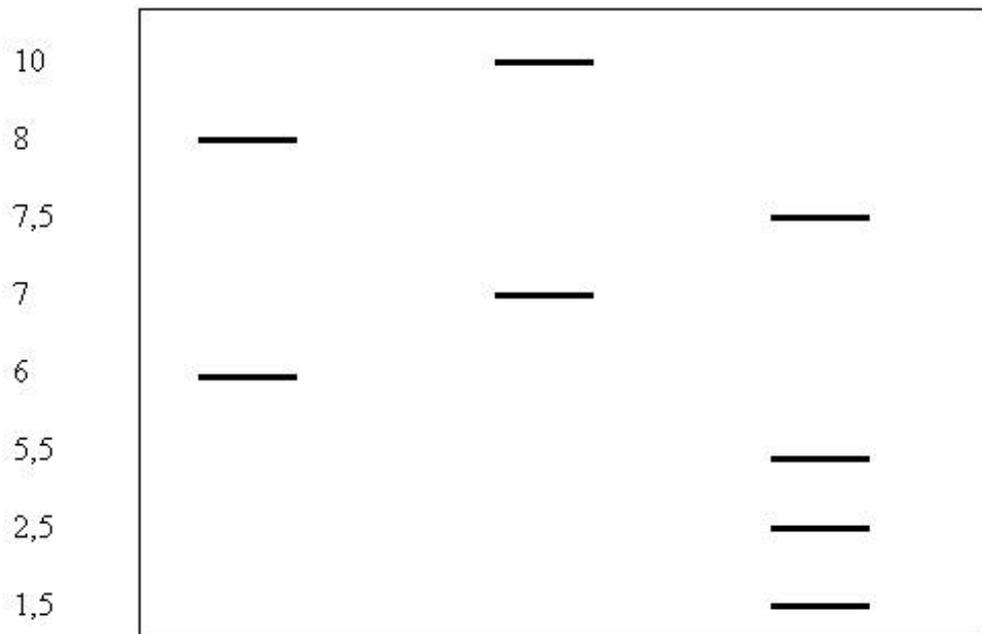
- Carte de restriction de l'ADN.

Les enzymes de restriction coupent l'ADN au niveau de séquences parfaitement définies. Il est donc possible d'établir une véritable carte d'un gène donné par la technique de Southern Cette carte porte le nom de carte de restriction.

En pratique, l'ADN à étudier est réparti en différentes fractions. Chaque fraction est traitée par une enzyme de restriction ou un couple d'enzymes de restriction. Ainsi dans l'illustration ci-dessous. Dans le puits 1, on dépose l'ADN digéré par Eco RI seule; dans le puits 2, on dépose l'ADN digéré par Hind III seule et dans le puits 3, l'ADN digéré par Eco RI et Hind III. La détection des différents fragments est réalisée à l'aide d'une sonde marquée du gène étudié (voir illustration).

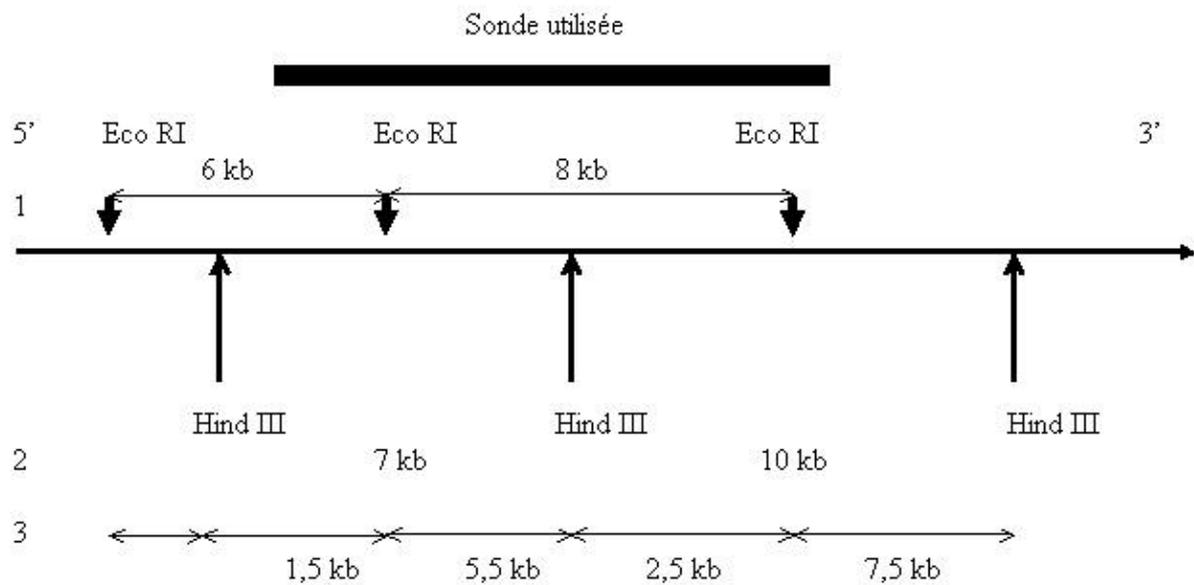
CATHODE

	1	2	3
en kb	Eco RI	Hind III	EcoRI + Hind III



ANODE

Illustration des positions sur l'ADN



Légende :

- (1): Position des coupures par Eco RI.
- (2): Position des coupures par Hind III.
- (3): Position des coupures par Hind III + Eco RI.

(- **Ex2** : Si on dispose de sondes spécifiques du gène à explorer. Mise en évidence des délétions dans un gène ou une zone juxta-génique. L'étendue de la délétion peut être estimée par la détermination de la taille des fragments d'ADN.

- **Ex3** : Comparaison de l'ADN de différents individus avec mise en évidence des polymorphismes de restriction.

En présence de mutation(s) ponctuelle(s) dans des sites de restriction, des variations dans la taille de certains fragments seront observées et ceci par exemple à l'intérieur d'une même population. Ces petites différences entre des individus dans une même population sont appelées le polymorphisme de taille des fragments de restriction (ou **RFLP** pour « restriction fragment length polymorphism »).

4-3-2 Northern Blot

Le principe est le même que pour le Southern Blot mais ici ce sont les **ARN** qui sont étudiés.

donc plus besoin de digérer par enzyme de restriction.

La visualisation d'un ARN par une sonde permet de :

- apprécier sa distribution dans les tissus, étudier son abondance relative
- déterminer sa taille
- détecter les intermédiaires de maturation et les différentes formes d'épissage de l'ARN.

4-3-3 Dot Blot

Cette technique permet de quantifier un ARN ou fragment d'ADN donné sans séparation préalable sur gel d'électrophorèse.

4-3-4 Hybridation in situ (HIS)

On appelle hybridation in situ (HIS) l'utilisation de sondes d'acides nucléiques pour mettre en évidence et localiser, dans des cellules ou des tissus, des séquences d'acides nucléiques, complémentaires de la sonde par leurs bases. L'HIS est un outil incomparable pour étudier l'expression des gènes. Elle est très proche, dans son principe, des Southern et des Northern blots et repose, comme eux, sur l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique (ADN ou ARN) marquée avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques que l'on cherche à identifier et à localiser. Mais les Southern et Northern blot se font sur des broyats de tissus, alors que l'HIS s'effectue sur une coupe histologique de tissu, apportant ainsi des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés. Les sondes utilisées sont le plus souvent de l'ADN (double brin ou plus rarement monobrin) ou un ARN-messager (riboprobes) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides).

4-3-5 Hybridation sur colonies

Transfert de colonies de cellules d'une boîte de Petri sur un filtre ou une membrane avant de procéder à une hybridation moléculaire de leur matériel génétique avec une sonde marquée.

4-3-6 Hybridation sur chromosomes (FISH)

La FISH (Fluorescence in Situ Hybridization) repose sur la capacité d'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires. La région à étudier (située sur un chromosome préalablement dénaturé légèrement par traitement chimique pour le débarrasser des protéines associées) est repéré grâce à une sonde oligonucléotidique complémentaire. Certains de ces nucléotides de cette sonde sont couplés à une molécule antigénique reconnue par un anticorps fluorescent. En utilisant diverses sondes, greffées à des antigènes différents, on peut ainsi visualiser simultanément plusieurs séquences sur un ou plusieurs chromosomes. Technique permettant de déterminer la position d'un fragment d'ADN dans le génome : le repérage se fait par rapport au bras du chromosome (p:bras court et q:bras long) et par rapport aux bandes (mises en évidence par la coloration Giemsa) du chromosome.

5 Amplification et sélection d'acides nucléiques particuliers

5-1 La PCR

Cette technique décrite en 1985 (K. MULLIS et collaborateurs) permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides en général). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces. Pour réaliser la PCR, il faut :

- une amorce
- la taq polymérase
- des DNTP

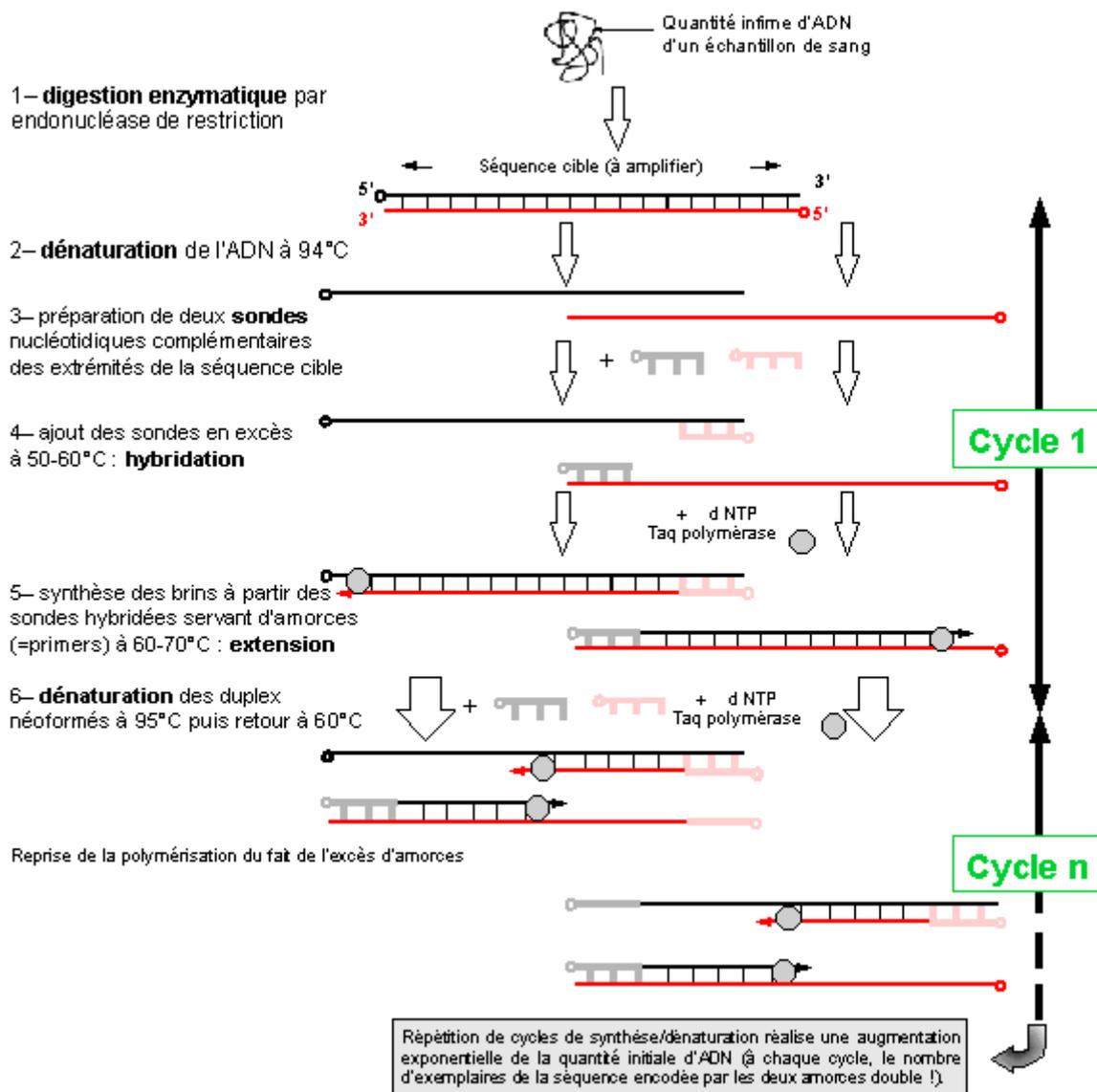
Réalisation pratique

La technique comporte des cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases:

- Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN (92-95°C)(30 secondes-1 minute).
- Une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques entre 55-60°C. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire (30 secondes-1 minute).
- Une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces à 70-72°C (1-2 minutes).

(Cette technique a pris un essor considérable avec l'introduction d'une ADN polymérase résistante à la chaleur.) L'ADN polymérase ou Taq polymérase est extraite d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*). Elle permet une automatisation des différents cycles (dans des appareils appelés thermocycleurs). Le nombre de cycles est généralement compris entre 30 et 40. Cette méthode permet d'amplifier l'ADN compris entre les deux amorces d'un facteur de 10^5 à 10^6 .

(Les résultats doivent être optimisés en fonction d'un certain nombre de paramètres: concentration en $MgCl_2$, concentration en amorces, spécificité des amorces etc... Le choix des amorces est particulièrement crucial pour obtenir des résultats satisfaisants (spécificité, taille, paramètres physico-chimiques.....). L'introduction de



logiciels spécialisés et des bases de données nucléotidiques a permis de réaliser des choix plus rationnels.)

La Taq polymérase extraite de *Thermus aquaticus* présente une activité exonucléasique 5' à 3', mais elle est dénuée d'activité exonucléasique 3' à 5', c'est-à-

dire de la fonction d'édition. Elle peut insérer des bases qui ne suivent pas la règle classique d'appariement et ceci au hasard. On estime qu'elle réalise une mauvaise incorporation toutes les 10^4 à 10^5 bases.

Cette technique a évolué considérablement. De nouveaux types de PCR ont été introduits. Nous citerons brièvement:

- La PCR dite « Multiplex » pour amplifier des gènes avec de nombreux exons (le gène CFTR impliqué dans la mucoviscidose possède 27 exons), il est possible d'introduire dans le milieu d'amplification des couples d'amorces spécifiques différentes.

- La PCR dite « Nested PCR ». Elle correspond à une seconde PCR réalisée en utilisant des nouvelles amorces situées à l'intérieur du domaine défini par les amorces de la première PCR.

- La PCR quantitative. Dans ce type de PCR, on cherche à estimer le nombre de copies présent dans la séquence cible d'ADN ou d'ARN. La proportionnalité entre le nombre d'amplifications et le nombre de copies n'est valable que pour un nombre de cycles PCR faible.

Exemple d'utilisations de la PCR

Les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont des marqueurs génétiques situés au niveau du génome qui servent à identifier un processus biologique. Toute forme allélique issue du génome peut-être utilisée comme marqueur moléculaire qu'il soit un fragment d'ADN codant ou non. Les marqueurs moléculaires servent à la description et à la définition d'individus, de clones, de lignées, voire de populations complexes. Ils sont également employés dans la mise en évidence et le suivi de gènes impliqués dans l'expression des caractères d'intérêt pour l'homme. Le développement de la PCR a permis la mise au point de marqueurs moléculaires plus performants qui sont couramment utilisés tels les microsatellites.

Les microsatellites

Les microsatellites sont des motifs de 1 à 6 nucléotides répétés en tandem qui font partie des familles de séquences simples répétées d'ADN. Les motifs répétés de plus de 6 nucléotides sont soit des minisatellites lorsque le motif comprend entre 7 et 70 nucléotides soit des satellites quand le motif est constitué de plus de 70 nucléotides. Le nombre de répétitions d'un motif de microsatellite peut varier de 2 à plusieurs dizaines. Les microsatellites sont nombreux chez les eucaryotes. On estime qu'il y aurait un microsatellite dinucléotidique tous les 30 à 100 Kb et une densité semblable pour les tri et les tétranucléotidiques. Ils sont aussi présents dans le génome des procaryotes et des bactéries.

C'est le polymorphisme extrêmement élevé de ces motifs répétés qui les rend très importants en génétique. Le taux de mutation dans ces séquences, se situe en moyenne entre 0,01 et 0,001 mutation par gène et par génération. La différence entre deux

génotypes se fait en nombre d'unités de répétition de la séquence de microsatellite. Les allèles d'un microsatellite diffèrent donc de quelques paires de bases.

Les régions flanquantes des séquences de microsatellites permettent de les amplifier spécifiquement par la technique de la PCR. Une paire d'amorces spécifiques de ces régions flanquantes, permet d'amplifier *in vitro* le microsatellite dont le polymorphisme sera révélé par électrophorèse sur gel d'agarose ou sur gel de polyacrylamide

5-2 La RT-PCR

La RT-PCR se déroule en deux phases. Une première phase correspond à la copie d'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur le ADNc synthétisé.

Dans la première phase, l'ARN messager à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul mARN auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme de ADNc simple brin), une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension.

L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique.

La technique RT-PCR a permis de montrer que la transcription de tous les gènes s'effectuait dans tous les tissus et ceci même pour les gènes qui présentent une très grande spécificité tissulaire. On parle dans ces conditions de transcription illégitime. Il est évident qu'avant les techniques d'amplification génique, la sensibilité des méthodes classiques n'avait pas permis de mettre en évidence un tel phénomène.

Notions fondamentales

Longueur

$$1\text{m} = 10^3 \text{ mm} = 10^6 \text{ }\mu\text{m} = 10^9 \text{ nm} = 10^{12} \text{ pm}$$

$$1\text{m} = 10^{10} \text{ Angström (A}^\circ\text{)}$$

Poids

$$1\text{g} = 10^3 \text{ mg} = 10^6 \text{ }\mu\text{g} = 10^9 \text{ ng} = 10^{12} \text{ pg}$$

Poids Moléculaire (PM) : exprimé en Dalton (d)

$$1\text{d} = 1/6.10^{23} \text{ g}$$

$$1 \text{ acide aminé} = 110 \text{ d}$$

$$1 \text{ désoxyribonucléotide monophosphate} = 330 \text{ d}$$

Taille

$$1 \text{ kb} = 1000 \text{ pb}$$

$$1 \text{ tour de double hélice (le pas)} = 10 \text{ nucléotides} = 34 \text{ A}^\circ$$

EXERCICES

EXERCICE 1

On dispose de différentes molécules d'ADN A et B double brins constituée chacune de 647 pb. L'ADN A résiste à l'action des exonucléases alors que B est hydrolysé par ces enzymes.

1) Donner le poids moléculaire (en dalton) et la longueur (en μm) de ces ADN.

2) Pourquoi l'ADN A est insensible à l'action des exonucléases ?

Un autre ADN (C) étudié par microscopie électronique a montré qu'il est linéaire et mesure $0,33 \mu\text{m}$. Son poids moléculaire est de 291 000 d.

3) Déduisez de ces données la structure de l'ADN C

EXERCICE 2

Le contenu en guanine et en cytosine d'une molécule d'ADN est de 56 % quel est le pourcentage des 4 bases de cette molécule ? Une autre molécule d'ADN a une composition de 15 % de thymine quelle est sa composition en cytosine ?

EXERCICE 3

On sait que certains virus peuvent provoquer le cancer chez la souris. Supposons que vous avez purifié de l'ADN d'un virus de ce type. Vous mesurez chimiquement sa composition en bases et vous trouvez A=25 % ; T=33 % ; C= 18 % , G= 28 %.

- 1) Que pensez vous de la structure de cet ADN ?
- 2) Comment ce virus pourrat-il se repliquer ?
- 3) Dans votre expérimentation vous observez que l'ADN virale est capable de s'hybrider avec l'ADN des cellules malades et pas avec l'ADN des cellules saines. Comment pouvez interpréter ces résultats ?

EXERCICE 4

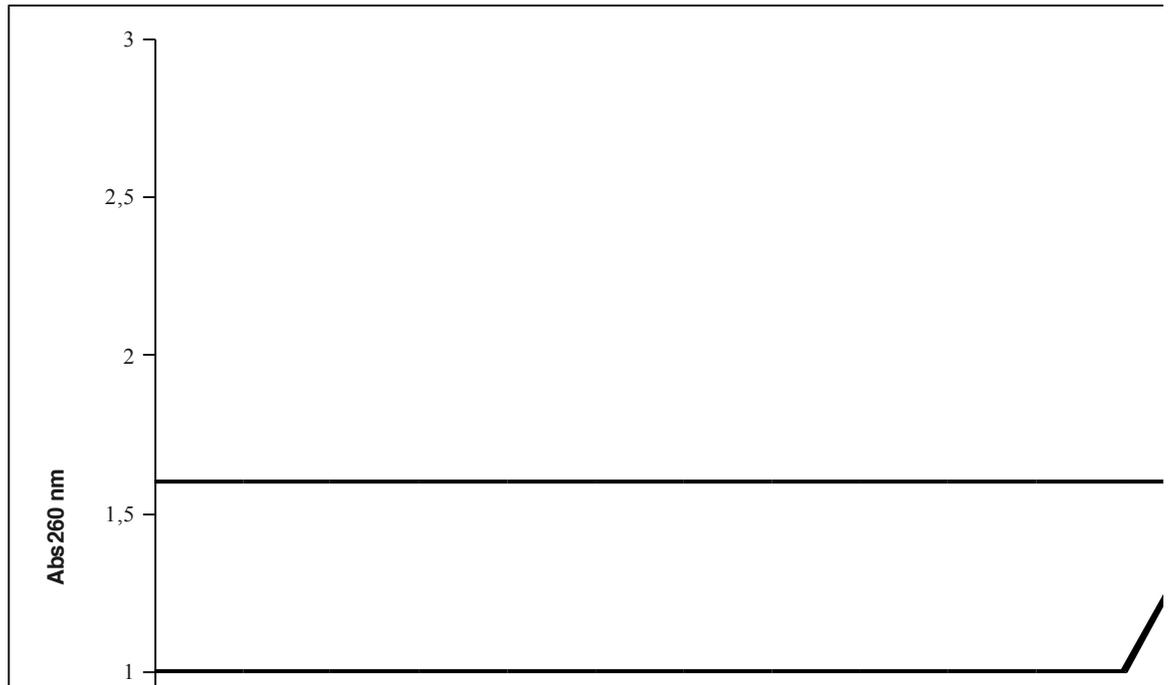
Une solution C1 d'ADN monocatenaire a une absorbance à 25°C de 2,8. On dilue 2,5 ml de cette solution pour obtenir 10 ml d'une solution C2. Représentez C1 et C2 sur le même graphique (absorbance en fonction de la température).

EXERCICE 5

Dans une expérience, on utilise un oligonucléotide de synthèse contenant 26 désoxynucléotides. A quelle température minimale doit-on laver le filtre d'hybridation pour être sûr de déshybrider l'oligonucléotide ? 5'-AGCTGGCTGCCATCGTACCCGTACAA-3'

EXERCICE 6

On dispose de deux solutions d'ADN X et Y de même poids moléculaire. Les deux solutions sont chauffées et on mesure ensuite leur absorbance à 260 nm. On établit ensuite la courbe de variation de l'absorbance en fonction de l'élévation de la température. Les courbes obtenues sont représentées ci-dessous.



- 1) Pourquoi mesure-t-on l'absorbance à 260 nm ?
- 2) On note une grande différence entre X et Y pour des températures inférieures à 65 °C. Comment pouvez vous expliquer cela ?
- 3) Sur chaque tracé, on observe une variation de l'absorbance lorsque la température s'élève. Qu'est ce que cela signifie ?
- 4) Pourquoi l'augmentation de l'absorbance ne se fait pas à la même température pour les deux solutions ? Que représente cette température pour chaque solution d'ADN. Déduire des ces données la différence entre les deux solutions d'ADN X et Y

EXERCICE 7

Le pourcentage de guanine et de cytosine d'une molécule d'ADN est de 60 %. Si le nombre d'Adénine est de 30, quelle est la taille de l'ADN en paires de bases, en Å et en µm ? Quel est son poids moléculaire en dalton et en Kd ?

EXERCICE 8

Pour extraire l'ADN d'une espèce végétale, quatre groupes d'étudiants utilisent des masses différentes d'un même matériel végétal.

- 1- Complétez le tableau ci-dessous sachant que les étudiants ont dissout leur ADN extrait dans 5 ml d'eau stérile.

Groupes	Facteur de dilution	DO à 260 nm	Masse de matériel utilisé (mg)	Rendement de l'extraction (%)
1	1	0,4		5

2	2		1,6	6
3	4	0,06	2	
4		0,3	1,5	10

- 2- Pourquoi dilue-t-on les solutions d'ADN avant lecture au spectrophotomètre ?
- 3- Comment expliquez-vous les différences de rendement observées entre les quatre groupes d'étudiants?

EXERCICE 9

Une solution d'ADN a une DO de 0,8 et de 0,42 respectivement à 260 nm et 280 nm.

- 1- pourquoi mesure-t-on la DO à ces deux longueurs d'ondes ?
- 2- Quel est le facteur de pureté de l'ADN ? Conclure.

EXERCICE 10

Avant dilution une solution d'ADN a une DO de 1,5 à 260 nm. Redoutant une erreur de précision pour des valeurs élevées de DO, des étudiants font une dilution de leur solution.

Quelle serait la mesure de la DO si le facteur de dilution est de 1,5 ; 1,8 ; 2 ; 4 et si la première lecture ne comportait aucune erreur? Sachant que le facteur de pureté de cet ADN est de 1,8 trouvez la DO à 280 nm pour chacune des dilutions.

EXERCICE 11

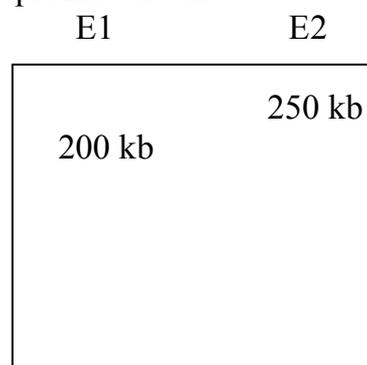
Les produits de digestion d'une molécule d'ADN par une enzyme de restriction sont constitués des fragments suivants :

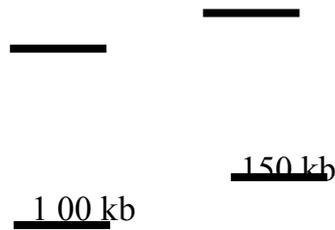
- fragment 1 : 10 kb
- fragment 2 : 800 kb
- fragment 3 : 400 kb
- fragment 4 : 1500 pb

- 1- Représentez schématiquement le profil de cette molécule après migration sur gel d'Agarose.
- 2- Quelle est la longueur totale de la molécule d'ADN initiale ?
- 3- Combien de site de coupures de l'enzyme de restriction présente-t-elle sur la molécule d'ADN si les bouts sont francs?
- 4- Proposer une carte de restriction de cette molécule d'ADN

EXERCICE 12

On réalise la digestion d'un fragment d'ADN avec deux enzymes de restriction. Après migration on obtient les profils suivants.





Construisez la carte de restriction du fragment d'ADN.

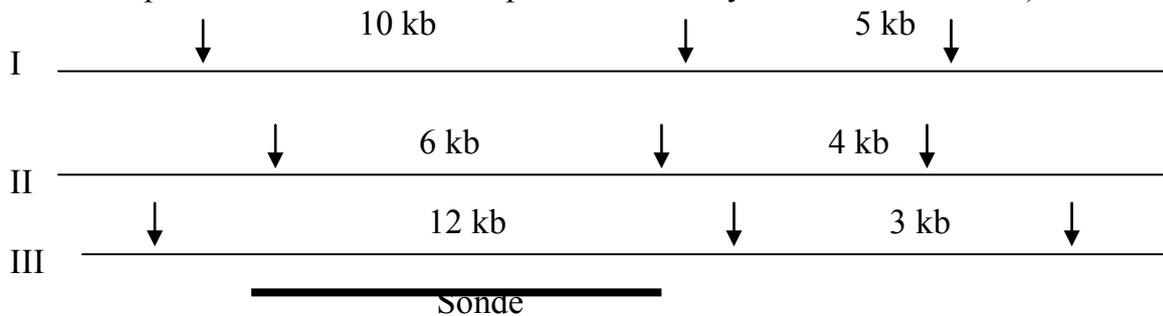
EXERCICE 13

Une enzyme tétramérique présente quatre conformation A1, A2, A3 et A4 telle que la charge $A1 > A2 > A3 > A4$.

- 1- Peut-on trouver les quatre conformations chez un même individu ?
- 2- Si non, combien de conformations peut-on trouver chez un même individu ?
Citez-les
- 3- Faites une représentation schématique de ces conformations sur gel pour les individus homozygotes et hétérozygotes

EXERCICE 14

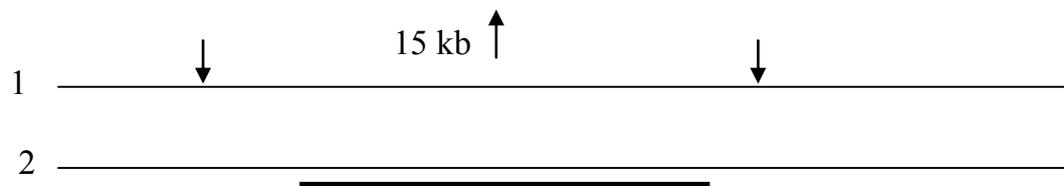
Soient les molécules d'ADN suivantes provenant de trois individus différents (les flèches représentent les sites de coupures d'une enzyme de restriction E1):



- 1- Faire le profil de ces individus après hybridation avec la sonde.
- 2- Faire le même profil si le deuxième site de restriction des individus II et III est muté

EXERCICE 15

Soit une paire de chromosomes homologues d'un individu diploïde.



- 1- Représentez le profil de cet individu après hybridation avec la sonde en gras.
- 2- Que serait le profil de cet individu si un fragment de 2 kb s'insérait sur le chromosome 1

- 3- Que serait le profil de cet individu si le chromosome 2 perdait un fragment de 2 kb.

EXERCICE 16

Vous avez cloné un fragment EcoRI de 6 kb dans un vecteur plasmidique qui mesure 2,9 kb. Vous vous proposez d'établir la carte de restriction de ce fragment. Pour cela, vous faites des digestions avec des enzymes de restriction seuls ou combinés deux à deux. Ces digestions donnent les résultats suivants :

Enzymes	Tailles des fragments après digestion (kb)
EcoRI	6 ; 2.9
BamHI	6.7 ; 2.2
HindIII	8.9
SacI	6.4 ; 2.5
EcoRI + BamHI	2.9 ; 2.8 ; 2.2 ; 1
EcoRI + HindIII	4.1 ; 2.9 ; 1.9 ;
EcoRI + SacI	2.9 ; 2.5 ; 2 ; 1.5
BamHI + Hind III	6.7 ; 1.9 ; 0.9
BamHI + SacI	6.7 ; 2.5 ; 0.5 ; 0.2
Hind III + SacI	6.4 ; 2.1 ; 0.4

On supposera que le fragment est cloné dans un site EcoRI et que le vecteur ne comporte aucun site correspondant aux enzymes utilisés.

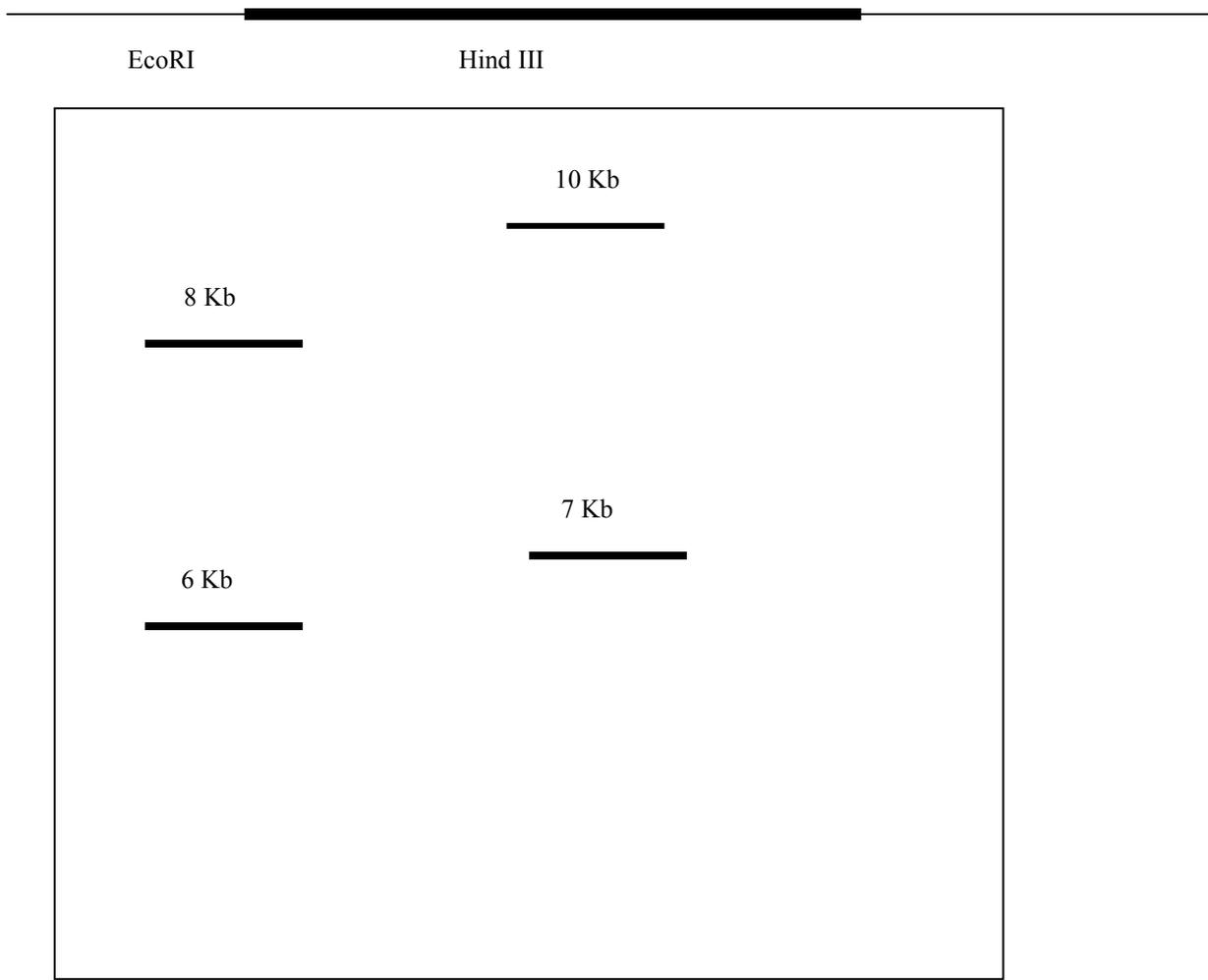
- 1- Faites la représentation schématique du profil de ces produits de digestion
- 2- Etablissez la carte de restriction du fragment EcoRI de 6 kb.

EXERCICE 17

La figure ci-dessous montre une molécule d'ADN de 25 kb. Cette molécule est digérée séparément par deux enzymes de restriction Eco RI et Hind III et les profils obtenus après hybridation par une sonde de 10 Kb sont représentés sur l'annexe B.

- 1- Qu'est ce qu'une enzyme de restriction ?
- 2- Comment nomme-t-on cette étude d'hybridation ? Donnez en les grandes étapes sans les commenter
- 3- Ces résultats sont ils suffisants pour établir une carte de restriction précise de la molécule d'ADN ? Expliquez votre réponse.

Représentez sur un schéma, des sites de restriction des deux enzymes : précisez les tailles de fragments qui séparent deux sites voisins (pour une même enzyme) et représentez la sonde comme sur l'annexe A.



EXERCICE 18

Le gène de la β -globine est contenu dans un fragment KpnI de 5.1 kb. La digestion de ce fragment avec EcoRI donne trois fragments de 2.5 kb, 1.8 kb et 0.8 kb. Seuls les fragments 2.5 et 0.8 kb s'hybrident avec la sonde β -globine. De même, les deux fragments de 3 kb et de 2.1 kb obtenus avec l'enzyme BamHI s'hybrident avec cette sonde. La cartographie de restriction de l'ADNc de la β -globine ayant montré qu'il n'y a que 76 pb entre les sites BamHI et EcoRI, que peut-on en conclure quant à la structure du gène de la β -globine ?

EXERCICE 19

Considérons les enzymes de restriction suivantes :

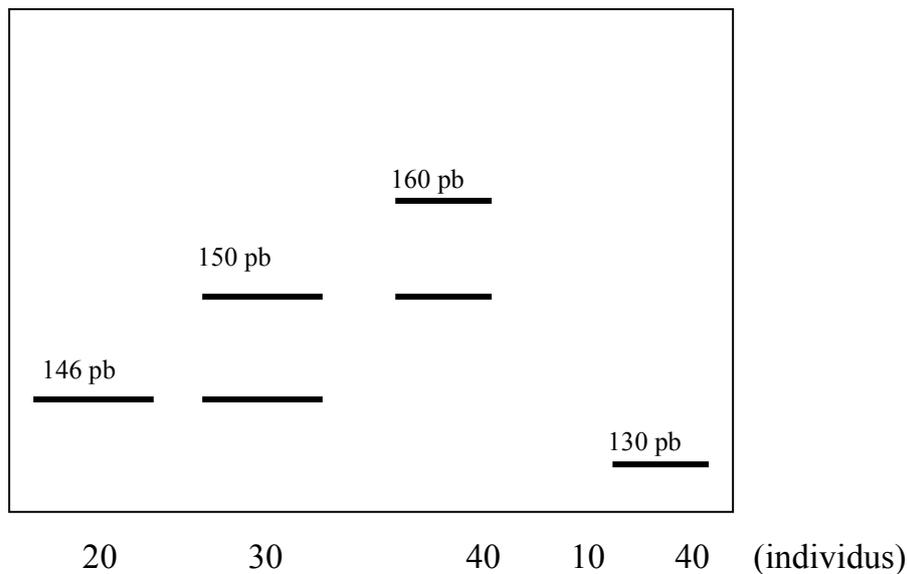
Enzymes	Sites de restriction
BamHI	G / GATCC

BglIII	A / GATCT
EcoRI	G / AATTC
HindIII	A / AGCTT
MboI	/ GATC
XmaI	C / CCGGG

- 1- Donnez les produits de digestion de ces enzymes à leur site de coupure
- 2- Parmi ces enzymes quelles sont celles qui ont des sites compatibles (extrémités cohésives capables de s'associer)?

Exercice 20

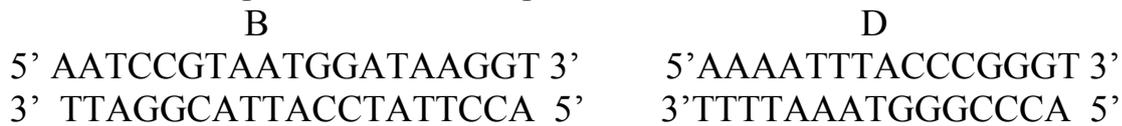
Le génome d'un individu sauvage d'une espèce forestière montre un microsatellite de 5 nucléotides d'une longueur de 140 pb. Dans une population de cette espèce forestière, on observe les profils suivant après migration sur gel d'Agarose.



- 1- Quel est le nombre total d'allèles dans cette population ?
- 2- Comment pouvez-vous renommer chacun de ces allèles ?
- 3- Comment expliquez vous les différences de longueurs entre les différents fragments ?
- 4- Expliquez pourquoi on n'observe pas de profil chez une dizaine d'individus de cette population

Exercice de séquençage de l'ADN selon la méthode de Maxam et Gilbert et la méthode de Sanger

I- Soient les séquences nucléotidiques suivantes :



Donner le profil électrophorétique de chacune de ces séquences si le séquençage se fait par la méthode de Maxam et Gilbert puis par la méthode de Sanger

II- Quel serait le profil électrophorétique d'une séquence microsatellite (AGATAC) répétée 5 fois pour chacune des deux méthodes.

III- Pour connaître la séquence d'une molécule d'ADN des étudiants de maîtrise utilisent la méthode de Maxam et Gilbert avec du DMS et de l'Hydrazine. Les résultats de la digestion de la molécule d'ADN par les produits utilisés sont consignés dans le tableau suivant.

tubes	1	2	3	4
nucleotides digérés	A + G	G	T + C	C
taille des fragments (nt)	15, 14, 13, 11, 10, 9, 8, 3, 2, 1	14, 13, 3, 2, 1,	11, 8, 6, 4, 3	5, 4, 3

- 1- Déterminer la séquence nucléotidique de cet ADN.
- 2- Que serait le profil si on utilisait la méthode de Sanger pour cette molécule?

EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE PAR LA METHODE QUIAGEN

- Allumer le bain-marie à 74 °c
- Peser environ 500 mg de feuille et broyer dans de l'azote liquide
- Transvaser le broyat dans un tube started de 15 ml
- Ajouter 5 ml de tampon d'extraction

- Vortexer 10 le tube
- Mettre le tube au BM à 74 °C pendant 30 minutes en l'agitant toutes les 5 mn
- Sortir le tube et le laisse refroidir à température ambiante
- Ajouter 5 ml de CIAA (24/1), mélanger doucement une cinquantaine de fois
- Centrifuger à 4000 tr / mn pendant 15 mn
- Transvaser la phase aqueuse dans un nouveau tube de 15 ml et ajouter 0,7 volume d'isopropanol pour précipiter l'ADN
- Après précipitation, récupérer la pelote d'ADN à l'aide d'une pipette crochet et la mettre dans un eppendorf de 2 ml contant 1 ml de tampon de reprise

TAMPON d'EXTRACTION	pour 500 ml
- 100 mM Tris-Cl pH 8	- 50 ml
- 1,4 M Nacl	- 140 ml
- 20 mM EDTA	- 20 ml
- 2 % MATAB	- 10 g
- 1 % PEG 6000	- 5 g
- 0,5 % sulfite de sodium	- 2,5 g