

TECHNIQUES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEES A LA MEDECINE

- Techniques générales
- Outils enzymatiques
- Hybridation moléculaire - Sondes
- PCR
- Analyse du génome : Southern - Séquençage - Puces
- Etude de l'expression des gènes
- Analyse génotypique
- Vecteurs et clonage
- Animaux transgéniques

TECHNIQUES GENERALES DE BIOLOGIE

MOLECULAIRE APPLIQUEES A LA MEDECINE

Références bibliographiques :

- **Biologie moléculaire et médecine : de la biologie à la clinique** (Kaplan et Delpech), Médecine-Sciences, Flammarion
- **Principes de biologie moléculaire en biologie clinique** (Ameziane, Bogard et Lamoril), Elsevier
- **Génétique moléculaire humaine** (Strachan et Read), Médecine-Sciences, Flammarion

1. Techniques générales

1.1. Matériel biologique

. Préparation de l'ADN

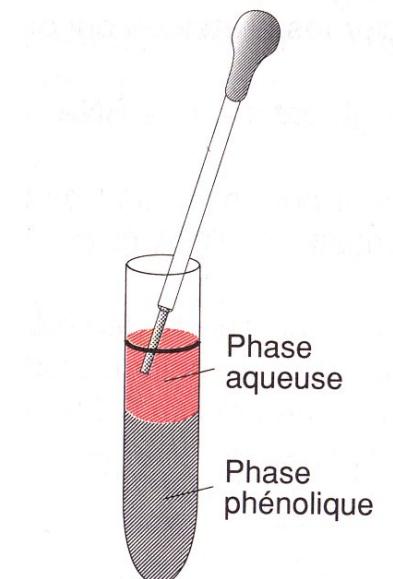
ADN nucléaire : 6 pg/noyau

(1 ml de sang = $5 \cdot 10^6$ cellules = 30 µg ADN)

. Préparation des ARN: *attention FRAGILE !*

1.2. Extraction

Solubilité différentielle des acides
nucléiques et des molécules
contaminantes entre
deux phases non miscibles



extraction : - au phénol

- au chloroforme ou à l'éther
- à l'isobutanol

1.3. Précipitation

- à l'éthanol

(2,5 vol. d'éthanol à 95° pour 1 vol. d'échantillon; -20 à -70 °C)

- à l'isopropanol

1.4. Dosage

**1 unité DO_{260nm} correspond à 50 µg/ml
(double brin)**

1,8 < Rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ < 2 si ADN pur

1.5. Méthodes de séparation

1.5.1. Electrophorèse

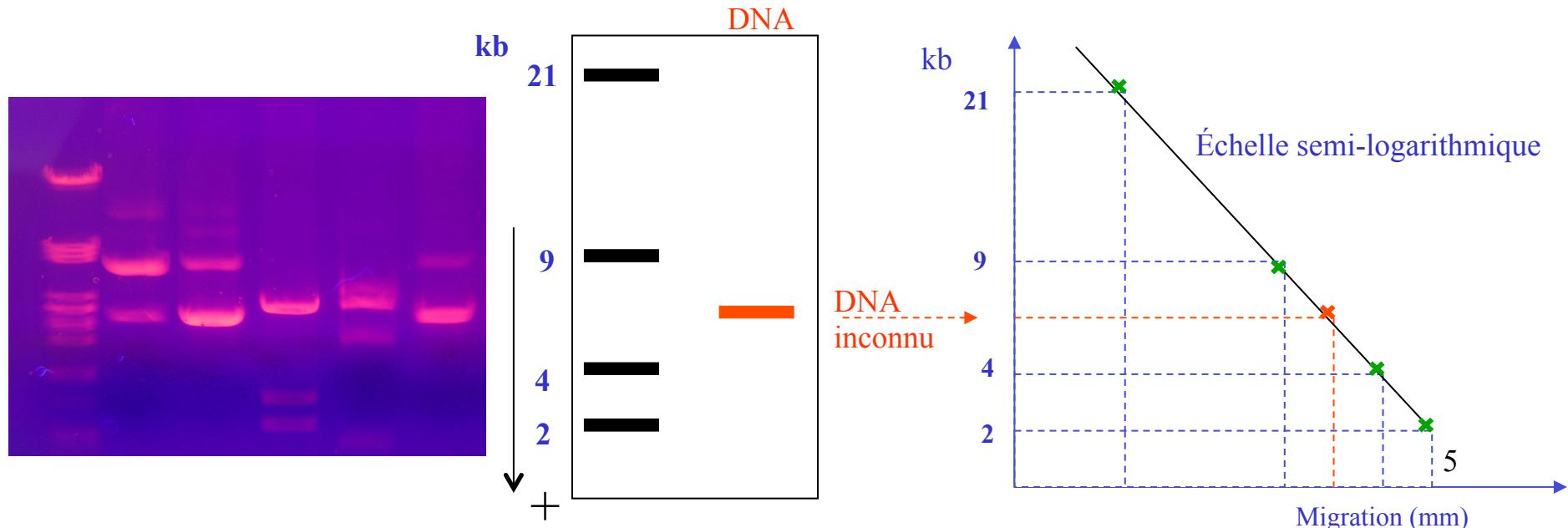
vitesse de migration fonction :

- masse moléculaire (nombre de bases)
- concentration du gel

.Gel d'agarose : fragments de 200 à 20 000 pb

(en champ pulsé : fragments 50 à 1000 kb)

.Gel de polyacrylamide : fragments de 10 à 800 pb



1.5. Méthodes de séparation (suite)

1.5.2. Ultracentrifugation

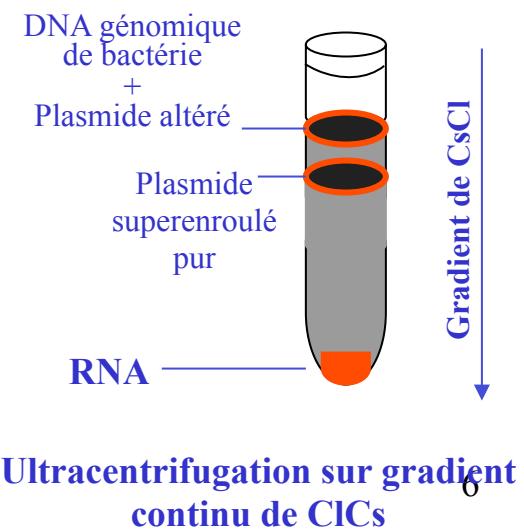
- en gradient de CICs
- en gradient de saccharose

1.5.3. Chromatographie

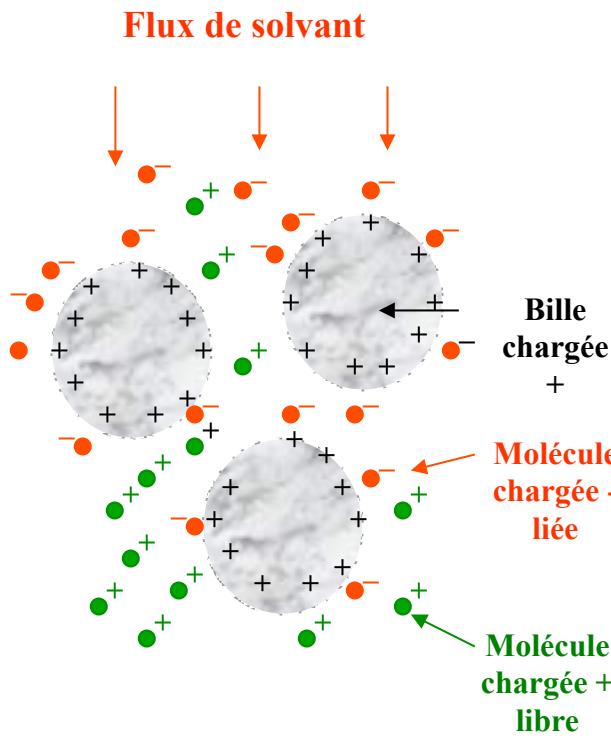
- d'affinité (poly-U; oligo-dT)
- gel filtration
- échangeur d'ions
- HPLC

1.6. Synthèse d'oligonucléotides

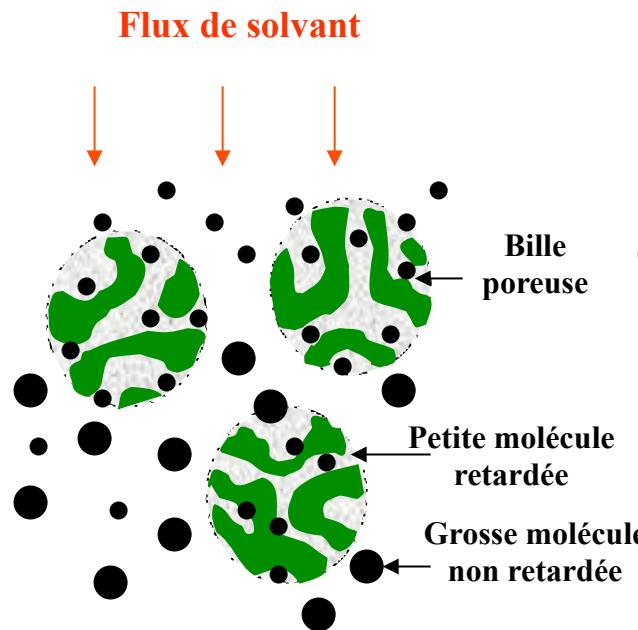
chimique



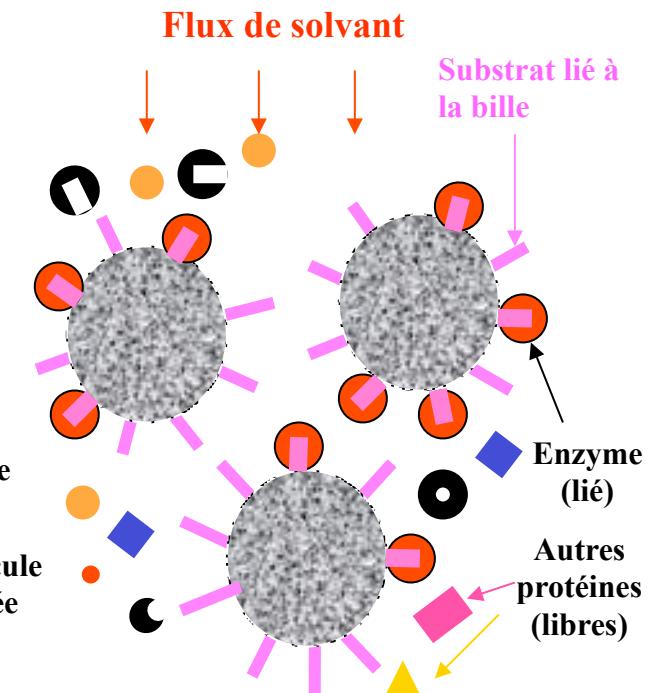
Principe de méthodes chromatographiques



Chromatographie
par échangeur d'ions



Chromatographie
par gel-filtration



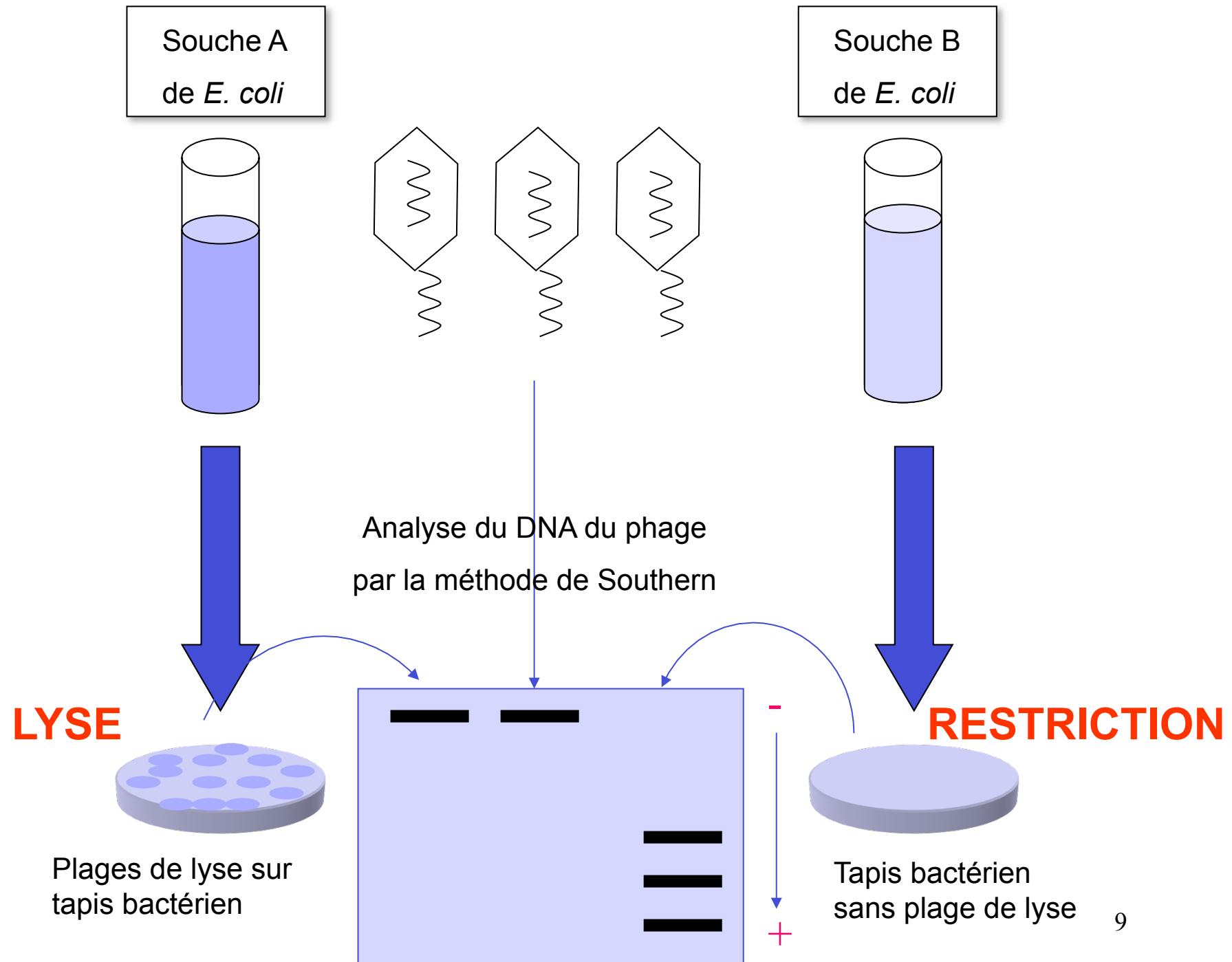
Chromatographie
d'affinité

2. Outils enzymatiques

2.1. Enzymes de restriction

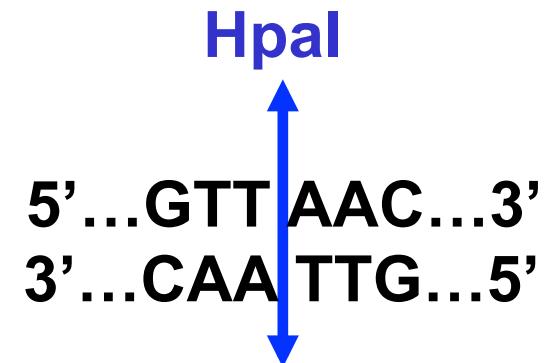
= Endonucléases coupant l'**ADN double brin** en des sites spécifiques

- . **Phénomène de restriction** (système de défense de la bactérie)
- . **Nomenclature** : Genre **espèce** (**Souche**) Numéro
- . **3 types**, dont type II : coupe **dans** la séquence reconnue
- . **Enzymes de type II**
 - Séquences palindromiques (*Esope reste ici et se repose*)
 - Bouts francs/bouts cohésifs (protusifs, collants, en baïonnette)
 - **Isoschizomères** (**certains sensibles de la méthylation**)

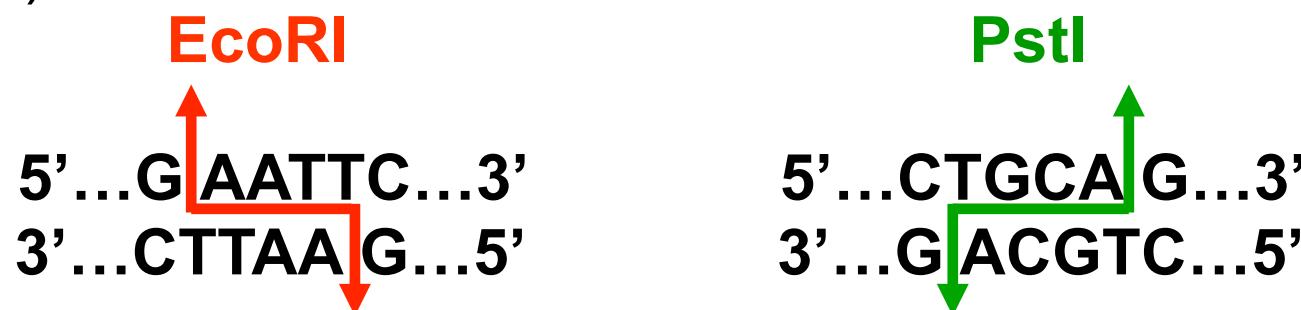


2.1. Enzymes de restriction (suite)

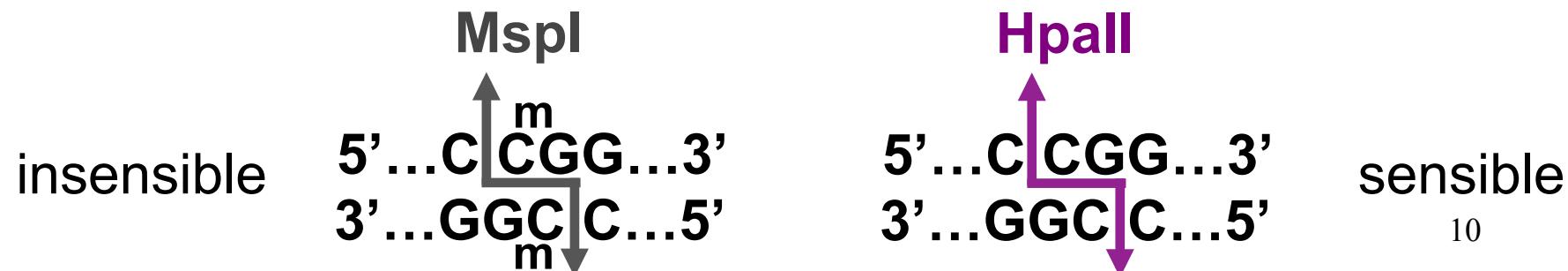
- Bouts francs



- Bouts cohésifs (protusifs, collants, en baïonnette)



- Isoschizomères et méthylation



2.2. DNA polymérases

2.2.1. DNA polymérase I (*E. coli*)

- activités :
 - DNA polymérasique $5' \rightarrow 3'$
 - exonucléasique $3' \rightarrow 5'$ et $5' \rightarrow 3'$
- fragment de Klenow : pas d'activité exonucléasique $5' \rightarrow 3'$

2.2.2. T4 DNA polymérase

2.2.3. Terminal-transférase (en 3' OH)

2.2.4. Transcriptase inverse (rérovirus)

- transcrit le RNA en cDNA, dans le sens $5' \rightarrow 3'$

2.3. RNA polymérases

- transcrivent DNA monobrin en RNA, dans le sens $5' \rightarrow 3'$
- nécessitent leur promoteur sur l'ADN à transcrire

2.4. Ligases

- forment des liaisons **phosphodiesters** entre 3' OH et 5' phosphate
- agissent sur:
 - . des bouts cohésifs (**ligase d'*E. coli***)
 - . des bouts francs (**T4 DNA ligase**)

2.5. Nucléases

2.5.1. DNases

- DNase I pancréatique:
 - . agit sur ADN simple ou double brin
 - . sites hypersensibles
- Nucléase S1: agit seulement sur l'ADN (ou l'ARN) simple brin

2.5. Nucléases (suite)

2.5.2. RNases

- **RNase A** : **très active, thermostable**
 - . coupe l'ARN simple brin (après pyrimidine)

- **RNase H** :

détruit l'ARN présent dans les hybrides ARN-ADN

2.6. Autres enzymes

2.6.1. T4 polynucléotide kinase

Transfère le phosphate en γ d'un ATP en 5' d'un polynucléotide

2.6.2. Phosphatase alcaline

Elimine le phosphate en 5' sur ADN, ARN ou nucléotides¹²

Application: préparation de cDNA

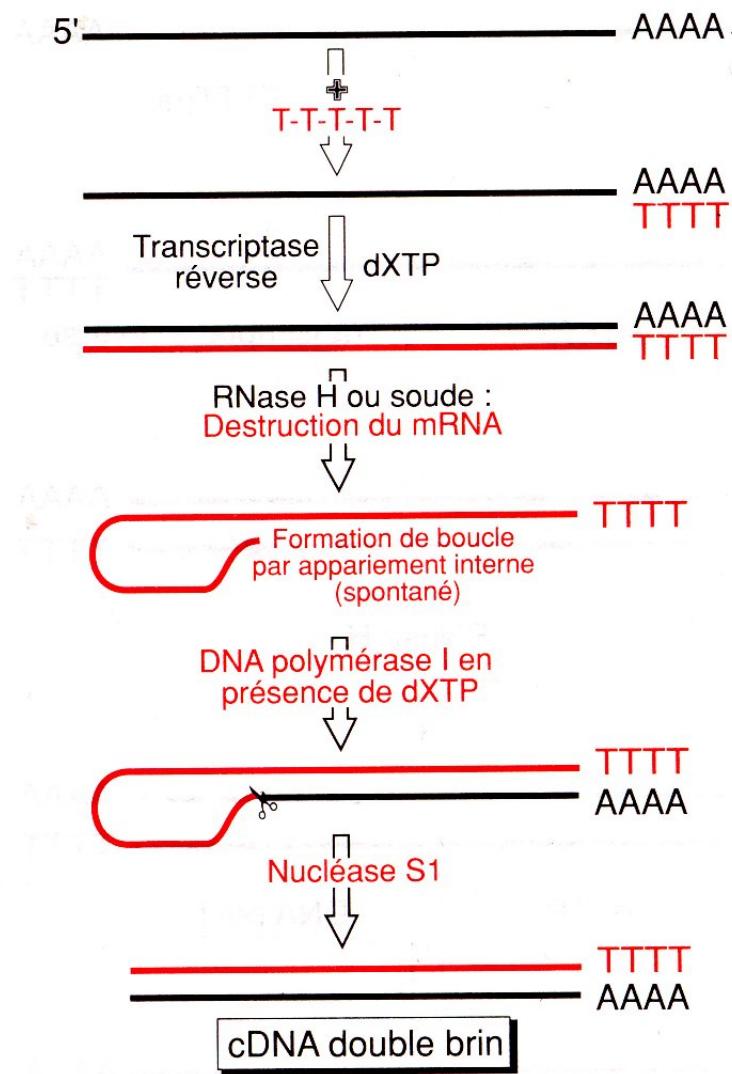


Figure 25-3 La technique originelle de synthèse de cDNA à partir de mRNA

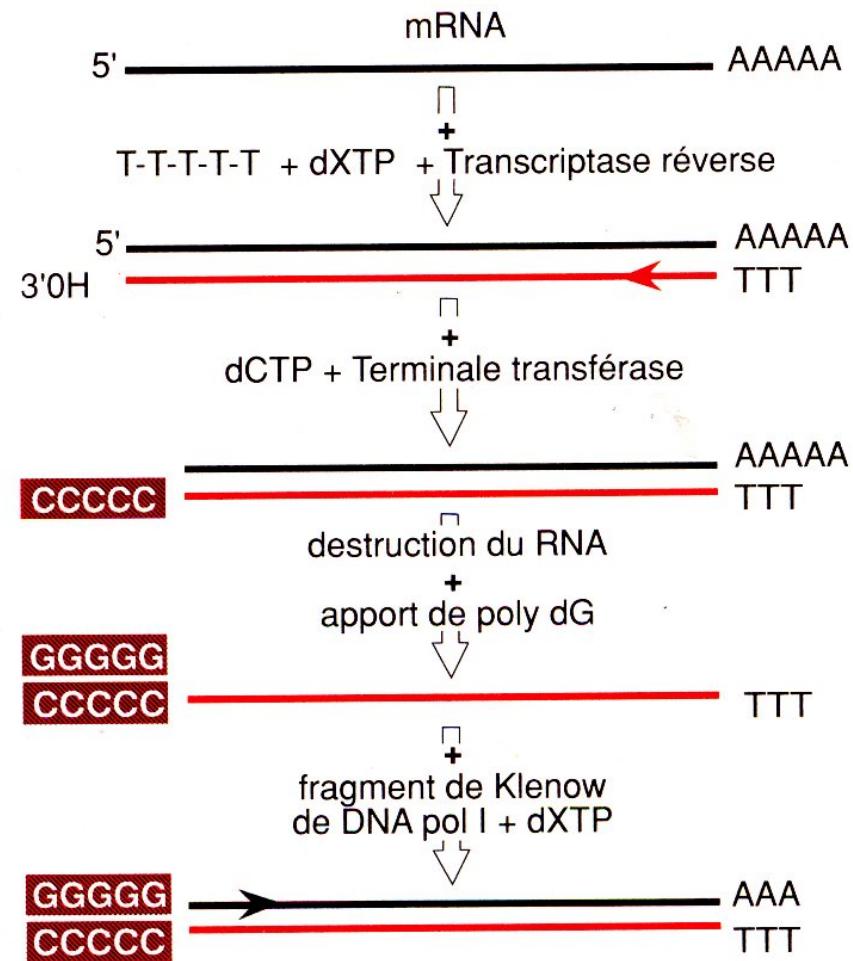
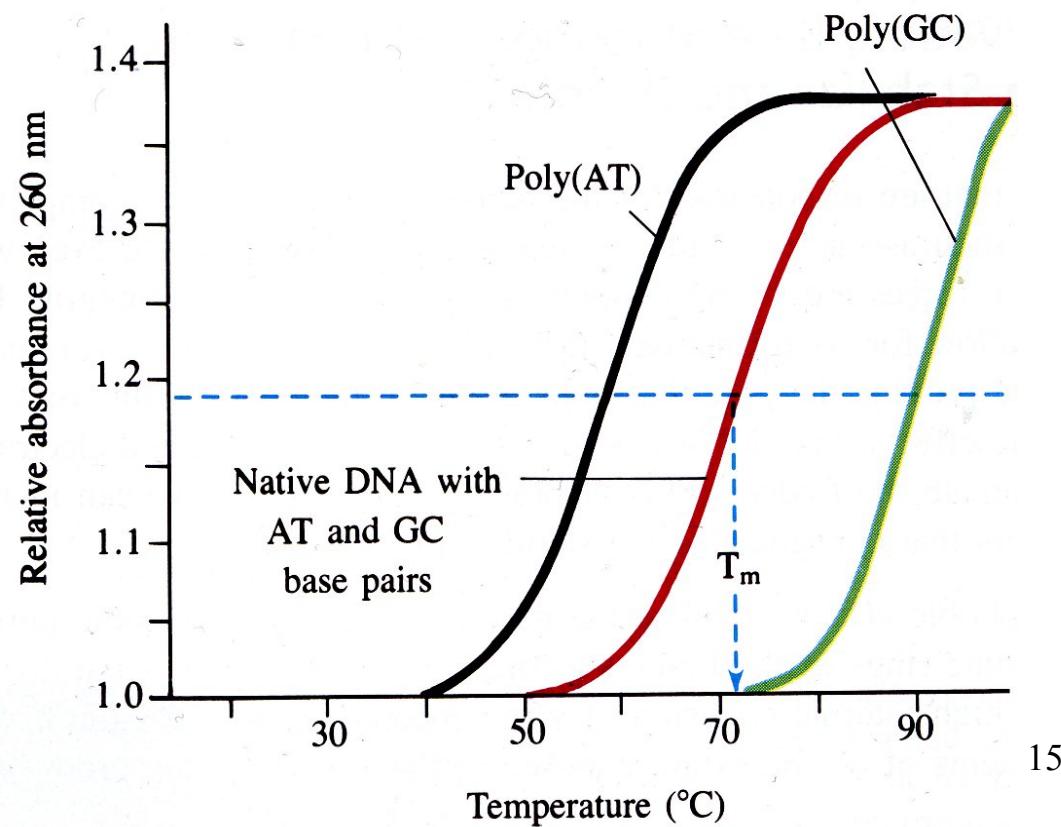


Figure 25-4 Synthèse de cDNA « copies entières » par la technique des queues simples (*tailing*)

3. Hybridation et sondes

3.1. Température de fusion : T_m

- . Phénomène de fusion : dénaturation
- . Effet hyperchrome



3.1. Température de fusion : Tm (suite)

. Facteurs influençant le Tm:

- composition en bases
- mésappariements
- **force ionique**

Stringence: une condition est d'autant **plus stringente qu'elle déstabilise** la double hélice (ex: solution saline diluée)

3.2. Hybridation

Réassociation des brins (si refroidissement lent)

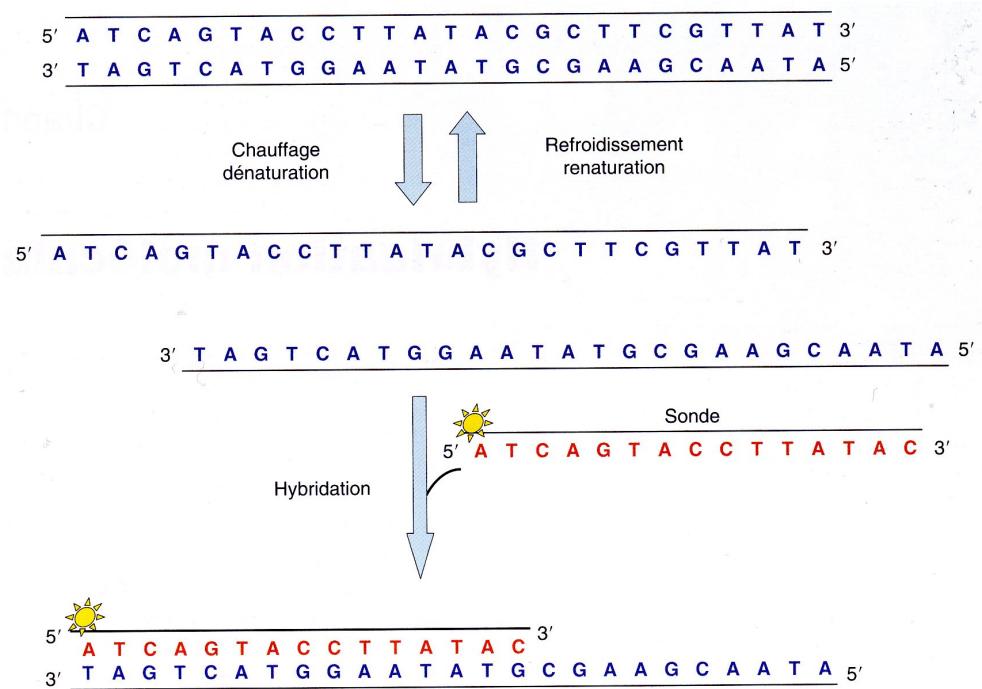
.Complémentarité des séquences → spécificité

.Facteurs influençant l'hybridation: Cot, force ionique

3.3. Notion de sonde

= **séquence polynucléotidique complémentaire d'un ADN ou ARN avec laquelle elle s'hybride**

- . DNA génomique
- . cDNA
- . RNA (ribosonde)
- . oligonucléotide



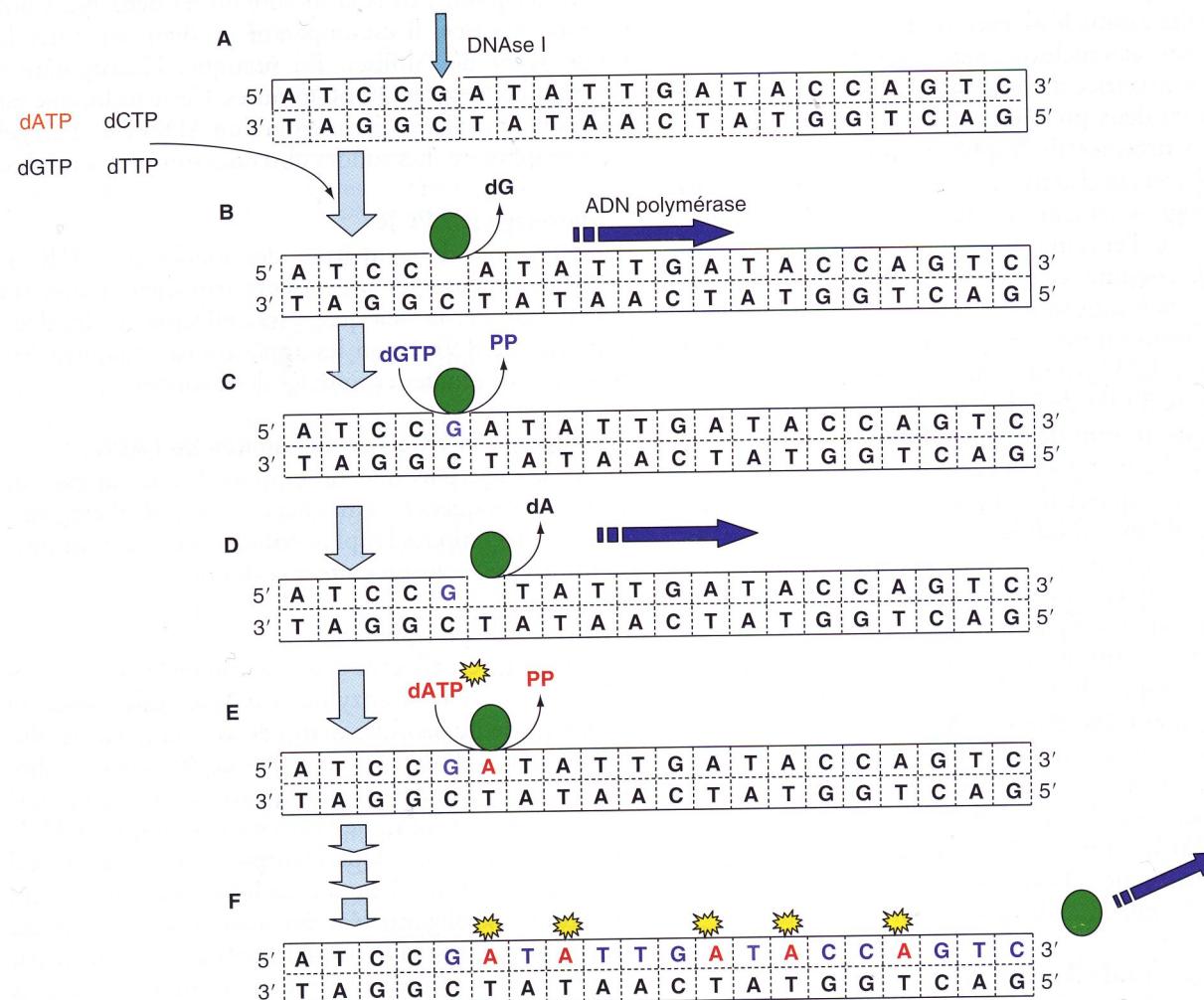
3.4. Marquage des sondes

3.4.1. Par quoi : marquage isotopique ou non

3.4. Marquage des sondes (suite)

3.4.2. Comment

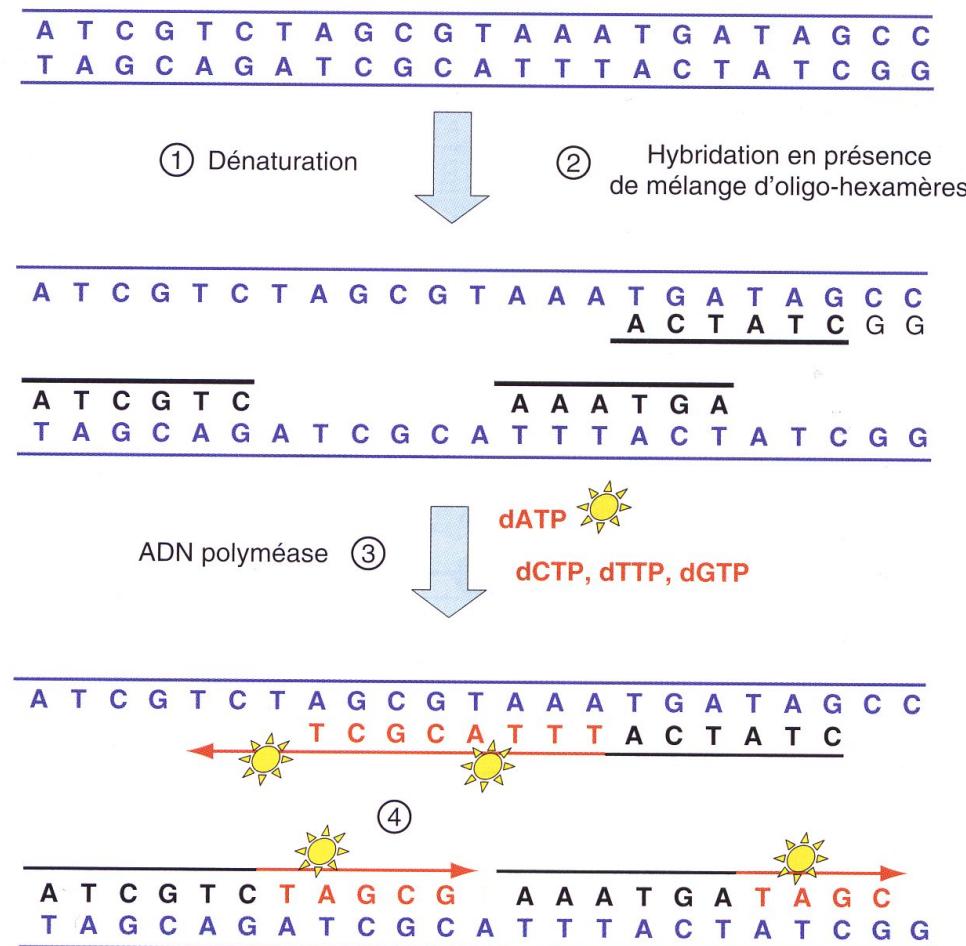
- translation de coupure (*nick translation*)



3.4. Marquage des sondes (suite)

3.4.2. Comment

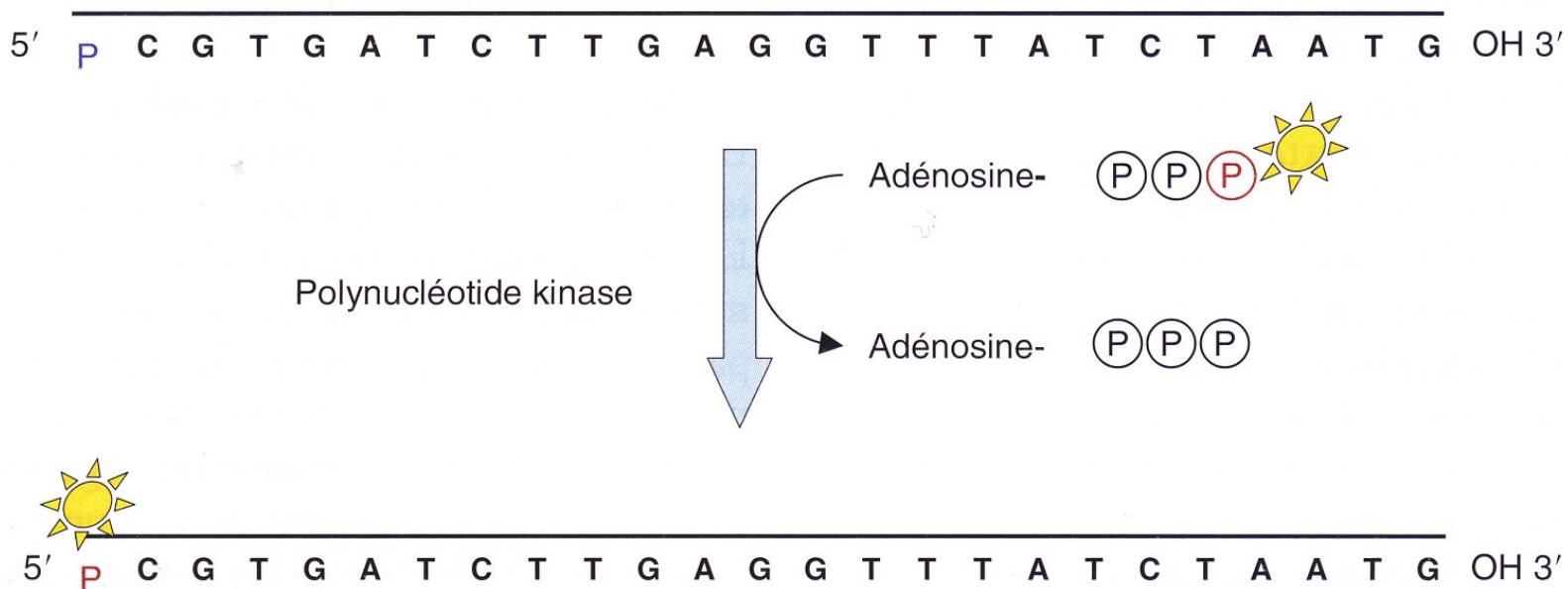
- avec hexamères aléatoires (*multi-random priming*)



3.4. Marquage des sondes (suite)

3.4.2. Comment

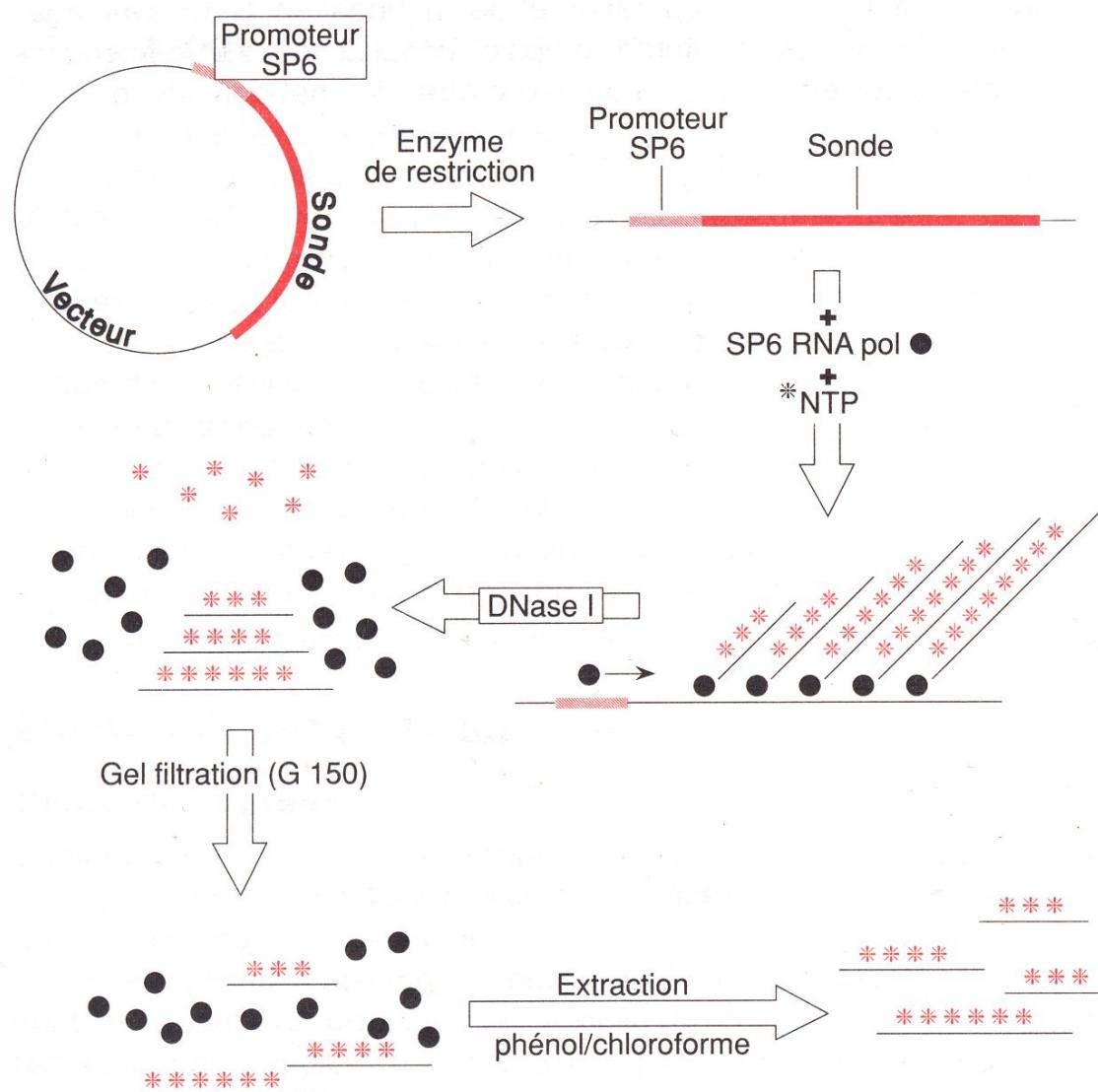
- T4 polynucléotide kinase



3.4. Marquage des sondes (suite)

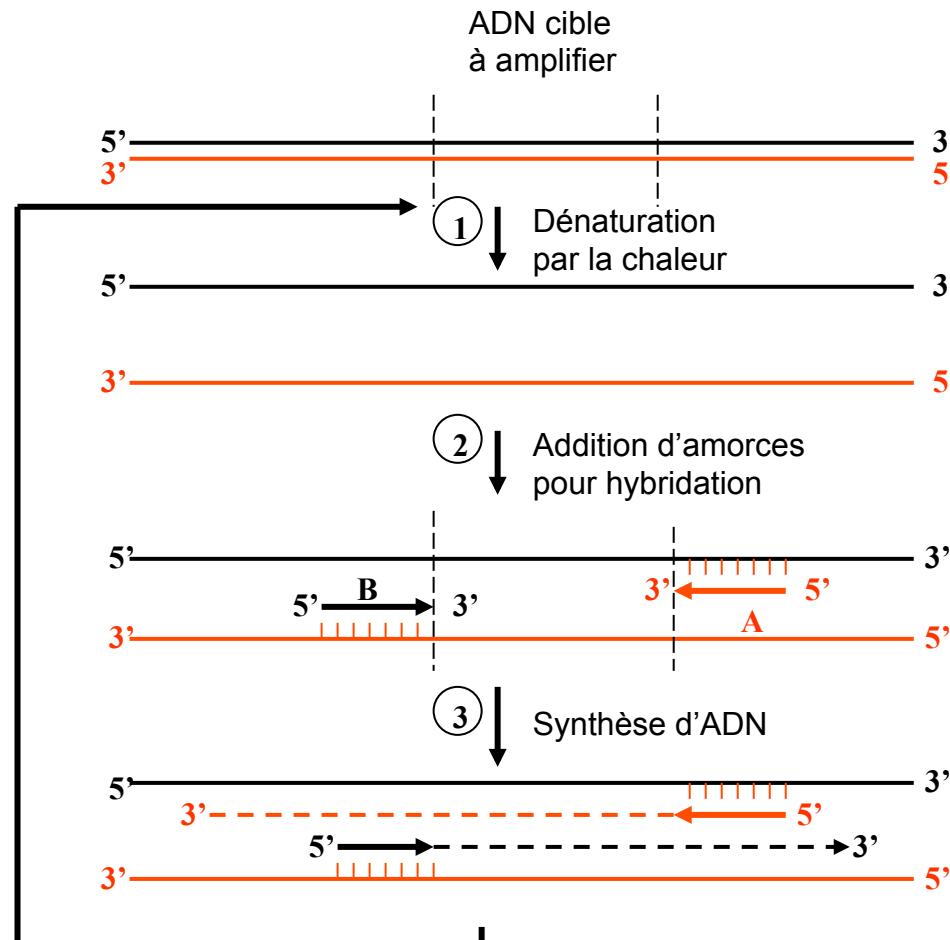
3.4.2. Comment

- ribosondes



4. PCR

Amplification élective in vitro (Polymerase chain reaction ou PCR)



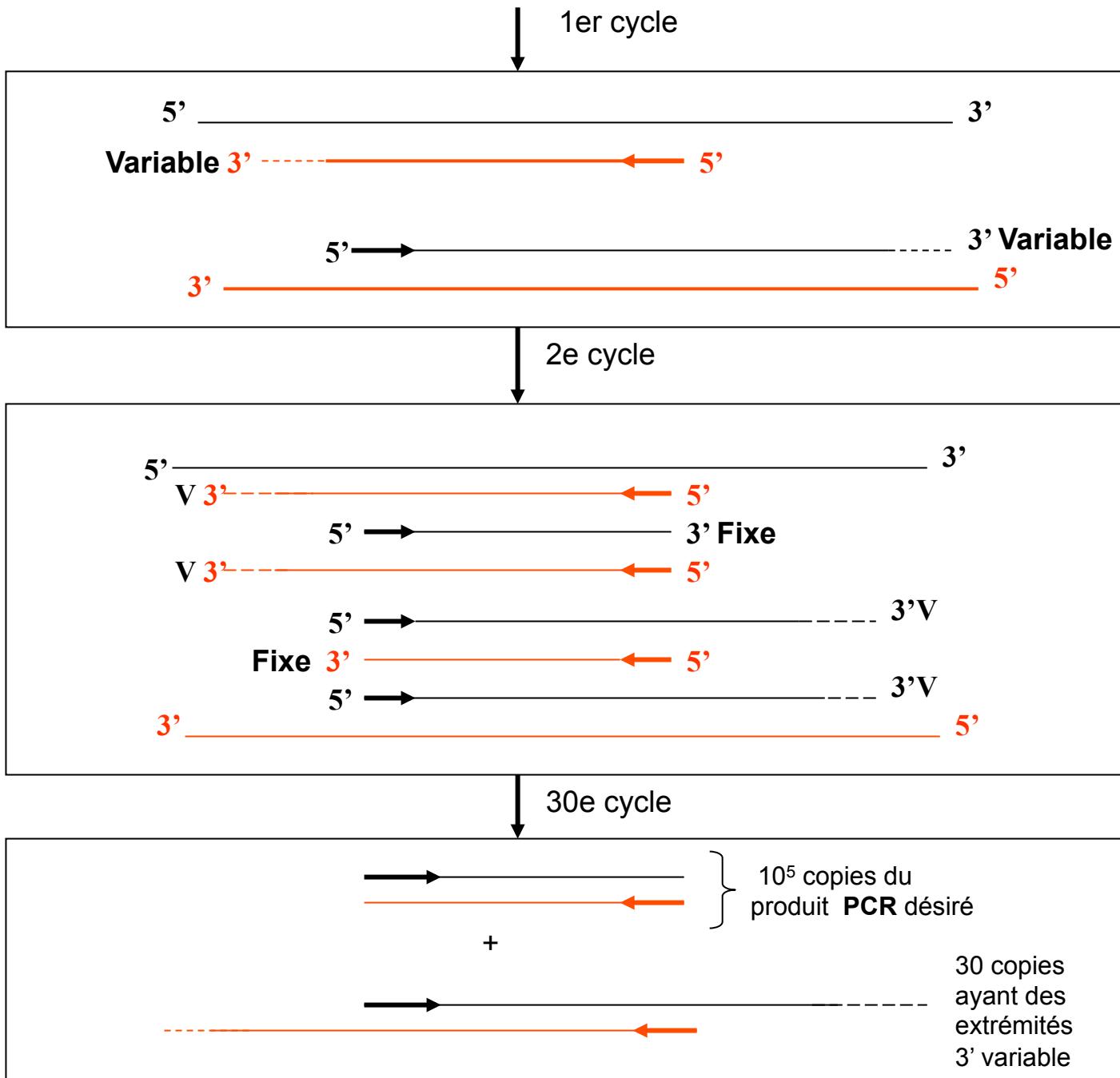
30 cycles

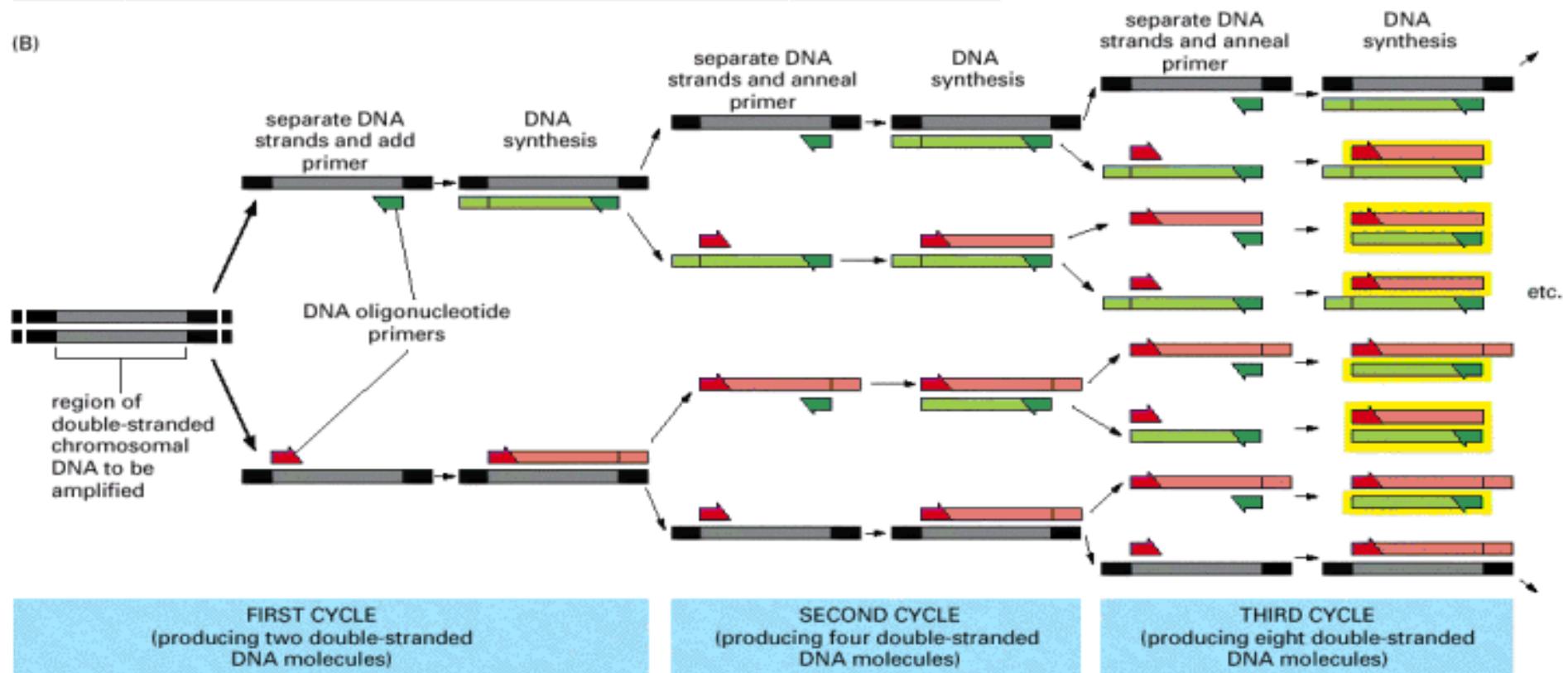
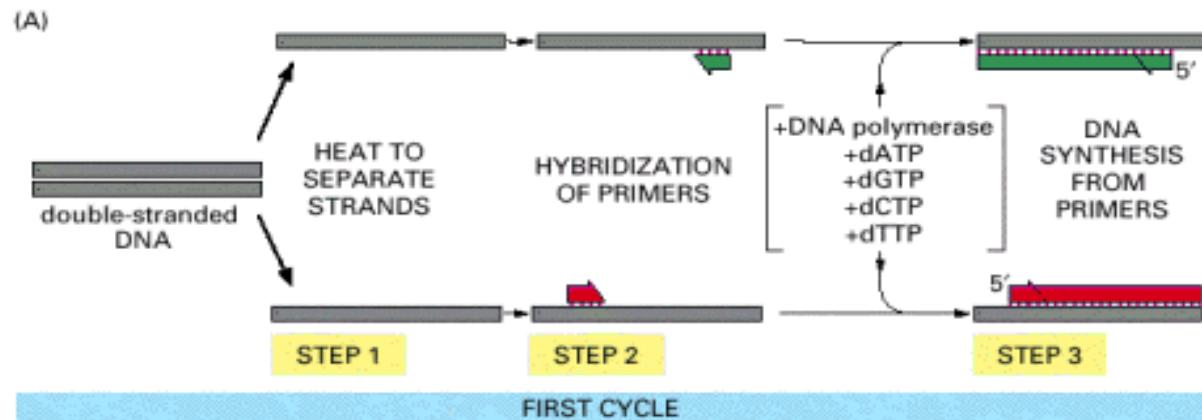
4. PCR

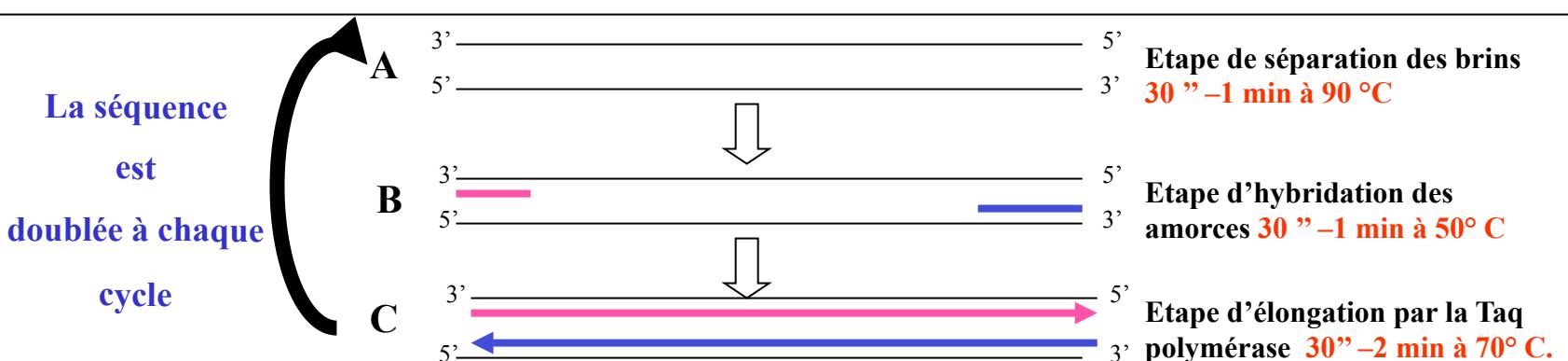
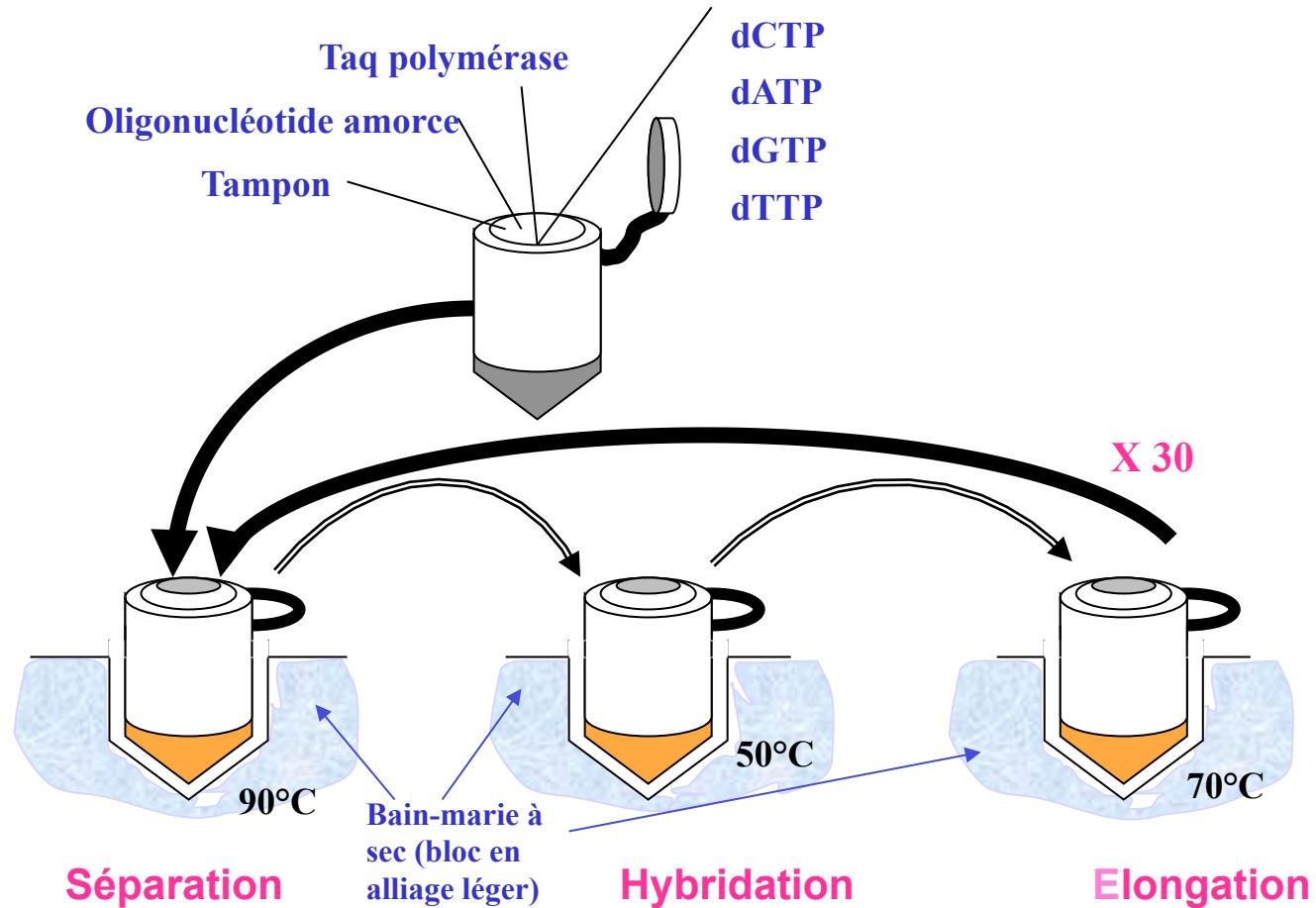
Amplification élective in vitro
(Polymerase chain reaction ou PCR)

4.1. Principes

- . DNA polymérase thermo-résistante (ex: Taq *Thermus aquaticus*)
- . Spécificité
- . Bon rendement, méthode puissante :
après N cycles, 2^N exemplaires du fragment d'ADN
(en théorie)
N copies à extrémité variable









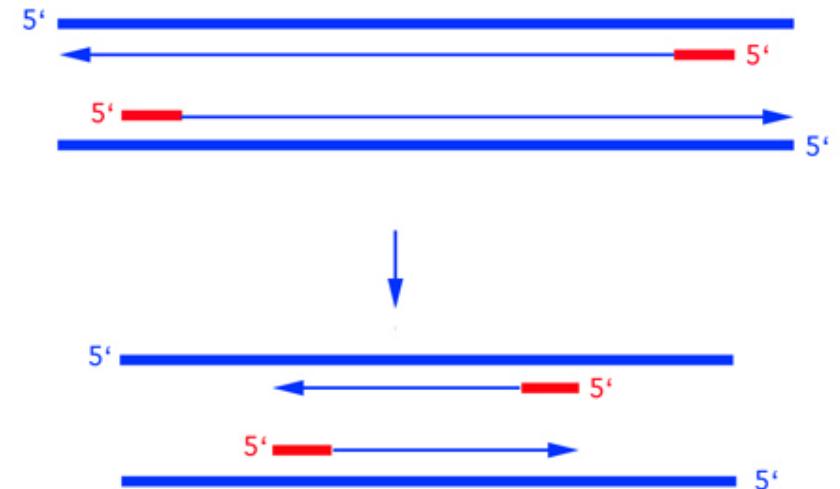
4. PCR (suite)

4.2. Limites

- . taille
- . besoin d'information sur la séquence de l'ADN cible
- . erreurs
- . amplifications parasites (\rightarrow **nested PCR**)
- . **Contaminations !!!**

4.3. Applications

- . génération de sondes
- . recherche de mutations
- . clonage
- . RT-PCR
- . PCR quantitative (**qPCR**)



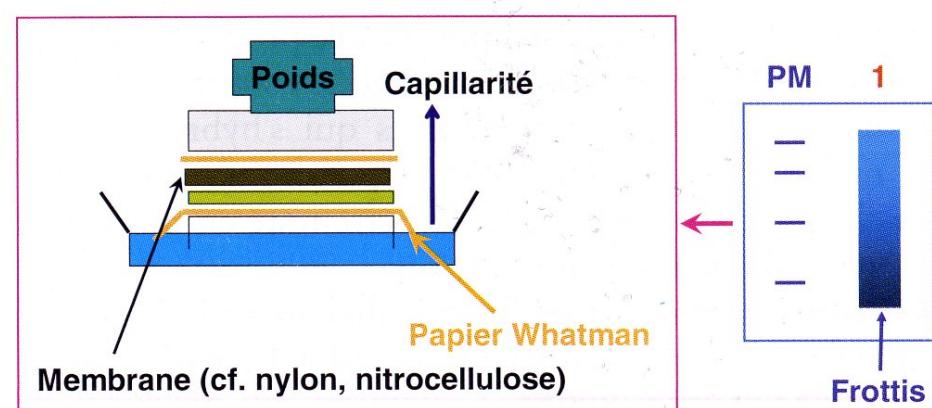
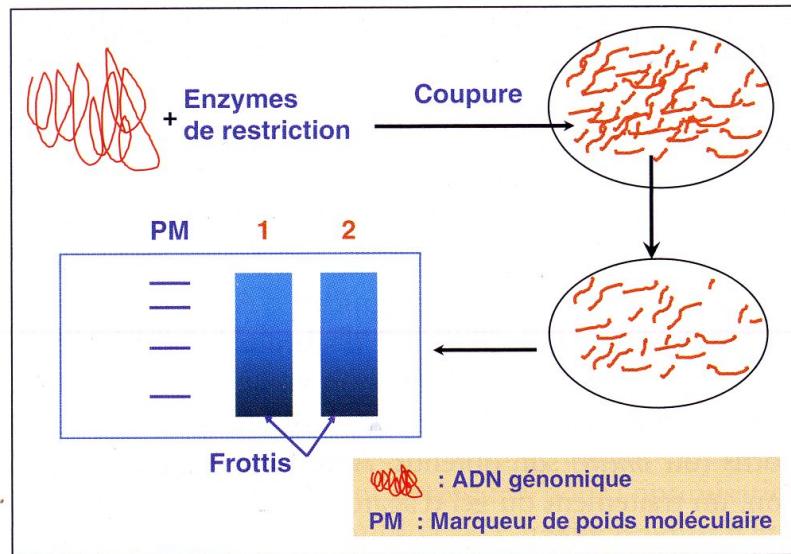
5. Analyse du génome

ADN nucléaire ou ADN mitochondrial

5.1. Southern blot

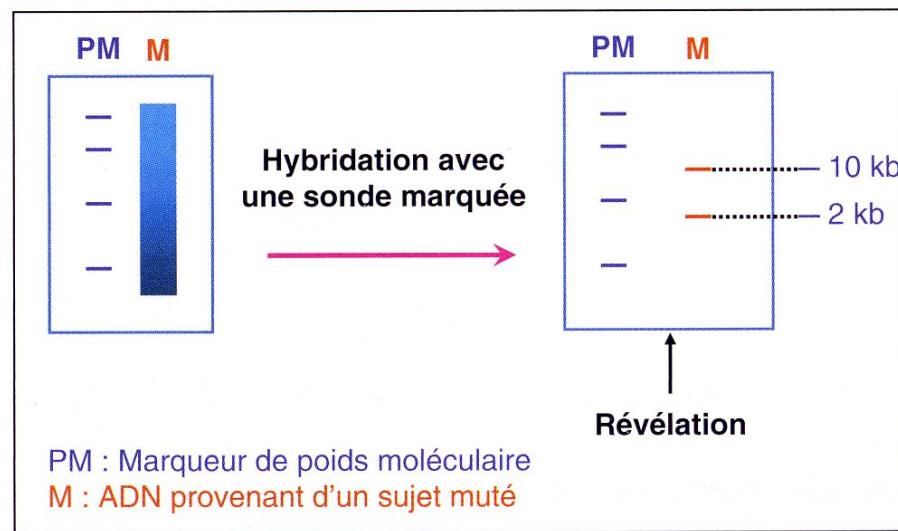
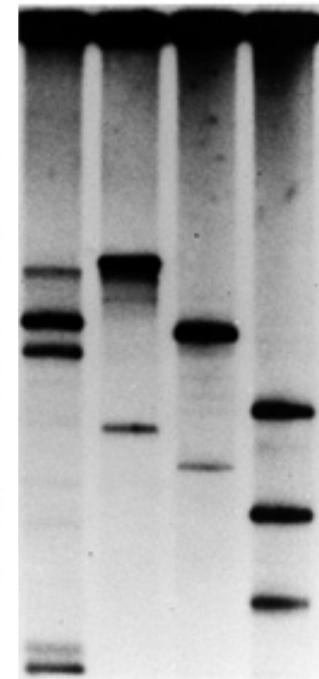
- . Fragmentation de l'ADN
- . Séparation par électrophorèse
- . Dénaturation *in situ*
- . Transfert par capillarité sur support solide
- . Pré-hybridation
- . Hybridation
- . Lavages (**Stringence !**) et Révélation des duplex

Southern blot



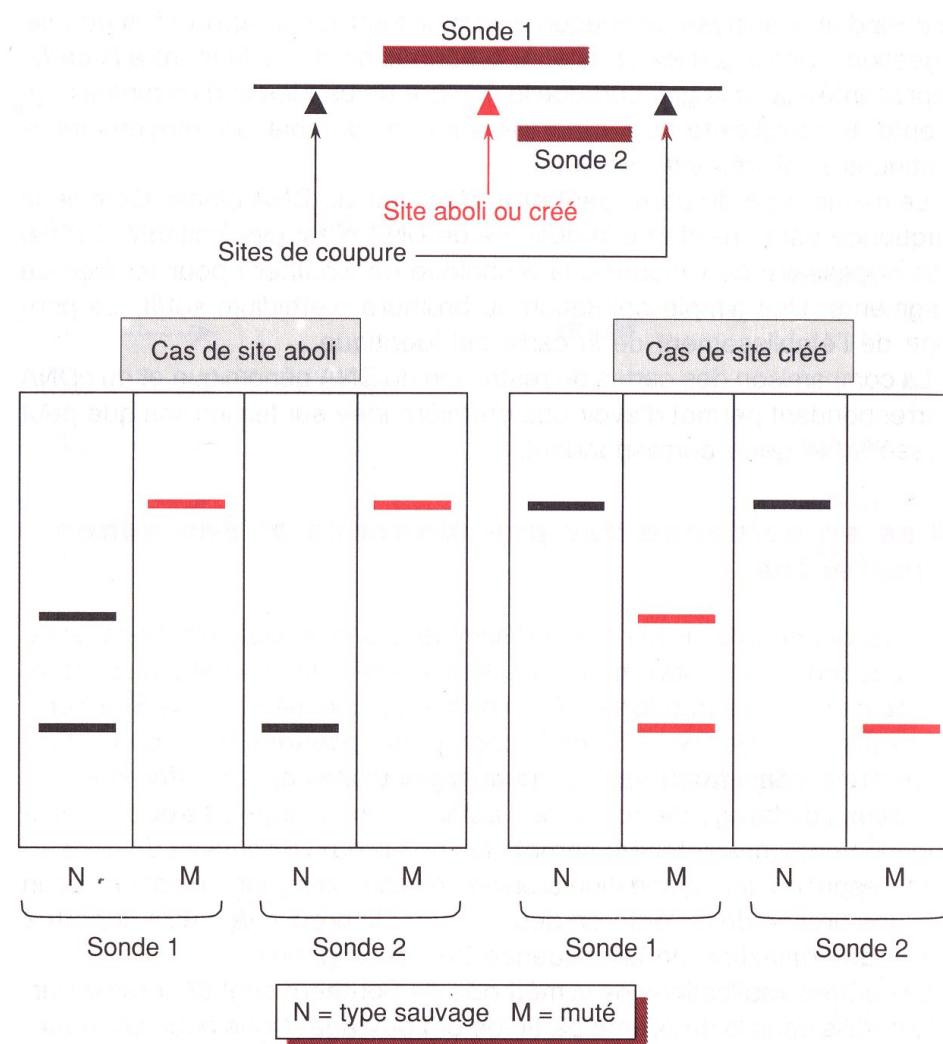
Legend: Papier absorbant (white), Solution alcaline (blue), Gel d'agarose (green).

BamHI, EcoRI, HindIII, PstI



5.1. Southern blot (suite)

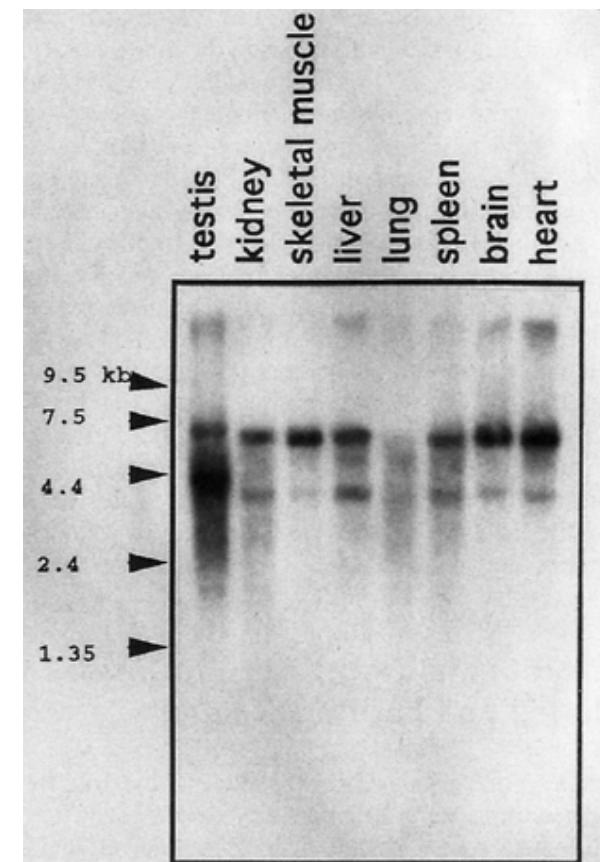
Application : détection de délétions / mutations



5.2. « Northern » blot

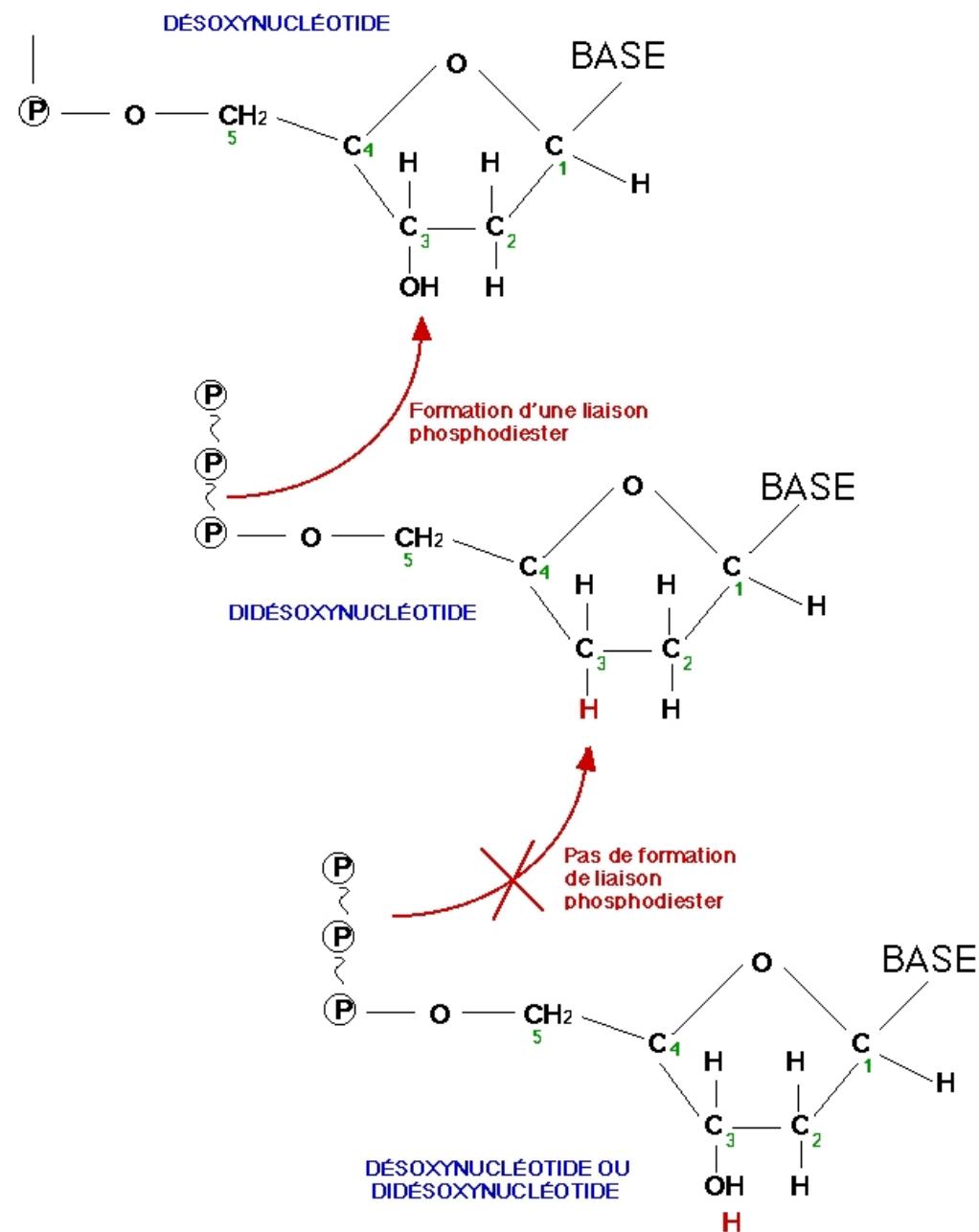
Analyse qualitative de l'expression génique

- présence ou absence d'un ARN
- taille de l'ARN
- intermédiaires de maturation
- variations semi-quantitatives



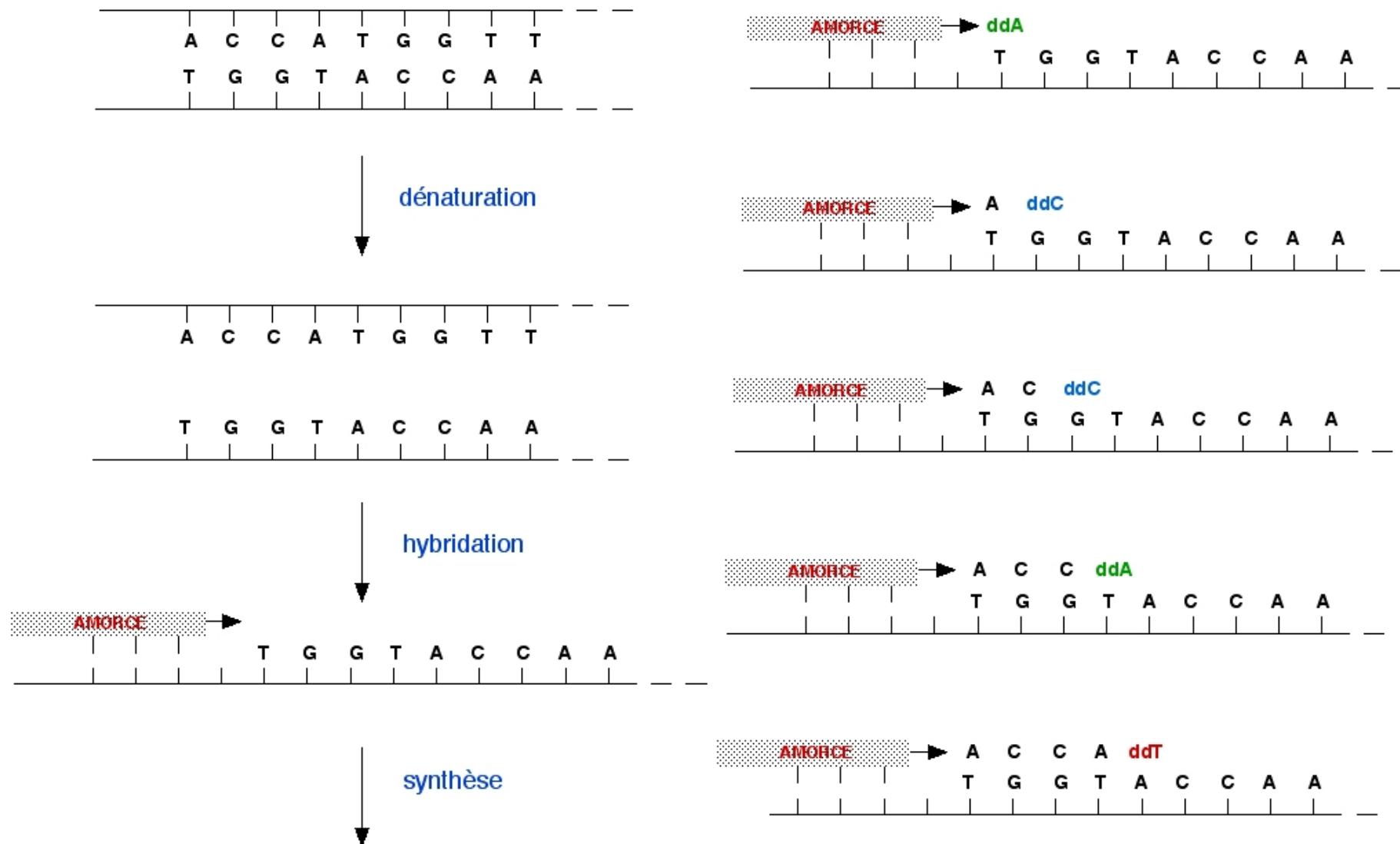
5.3. Séquençage

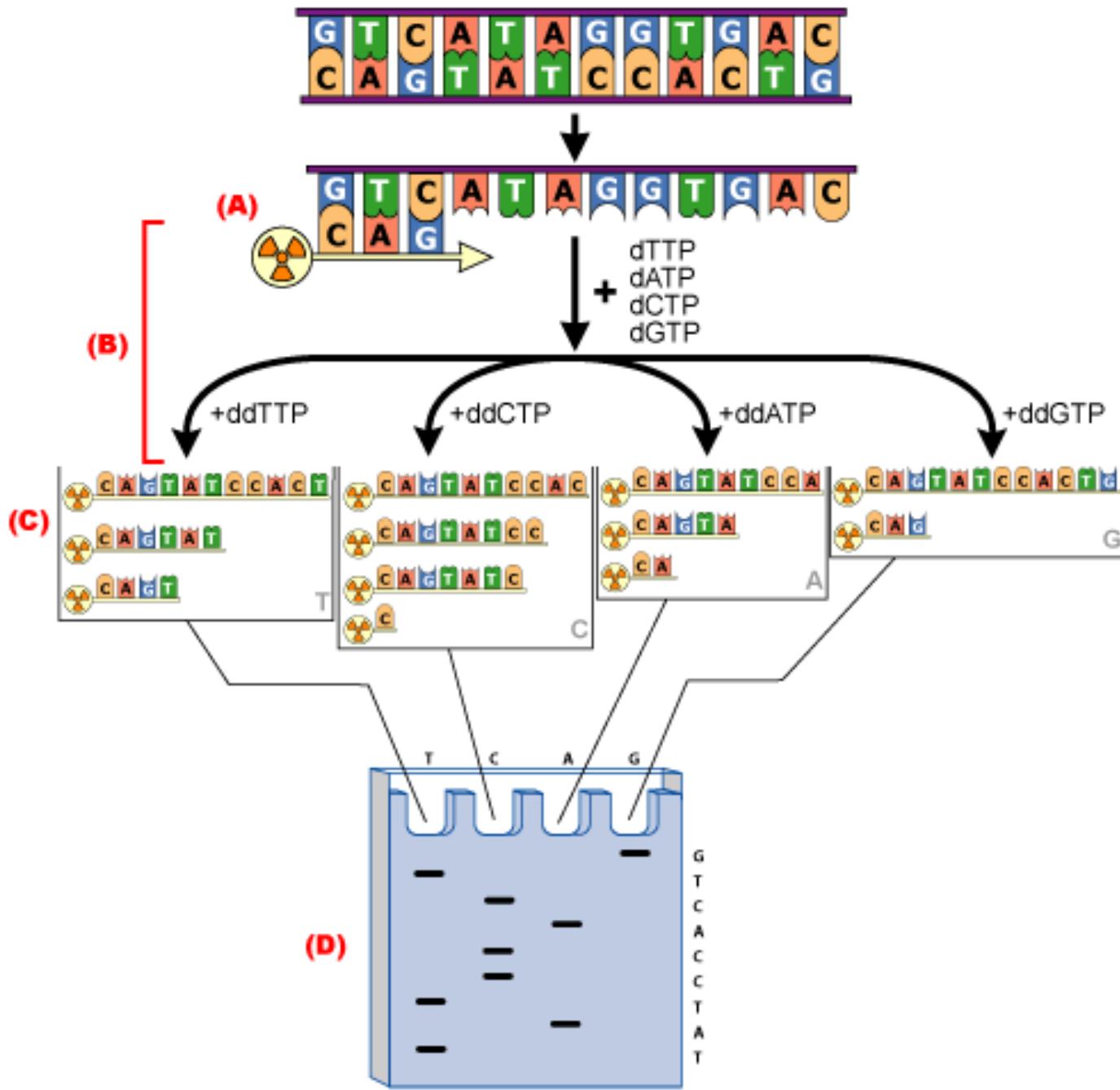
Méthode de Sanger
(aux didésoxy-nucléotides)



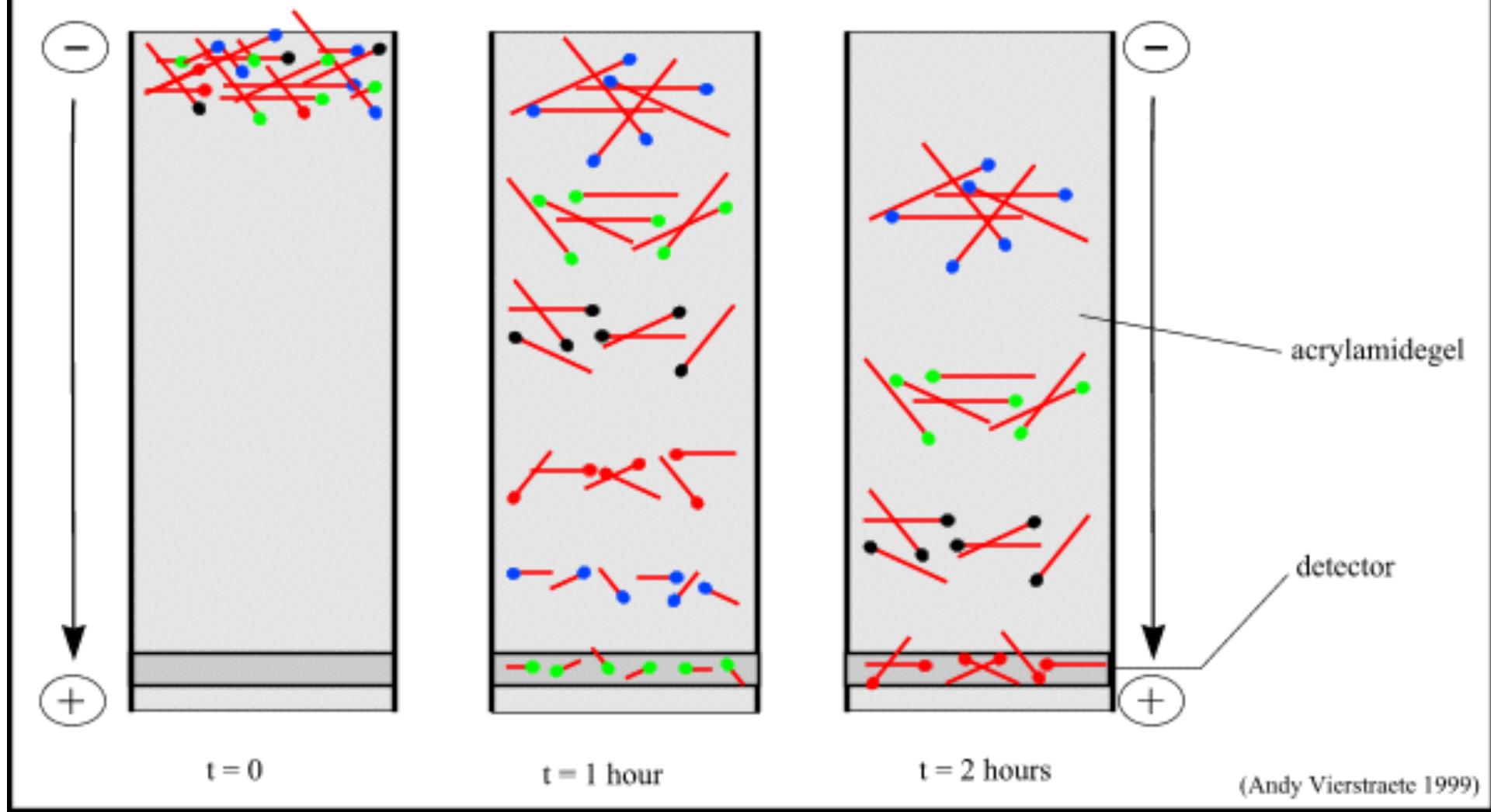
LE SÉQUENçAGE DE L'ADN

(méthode de Sanger)





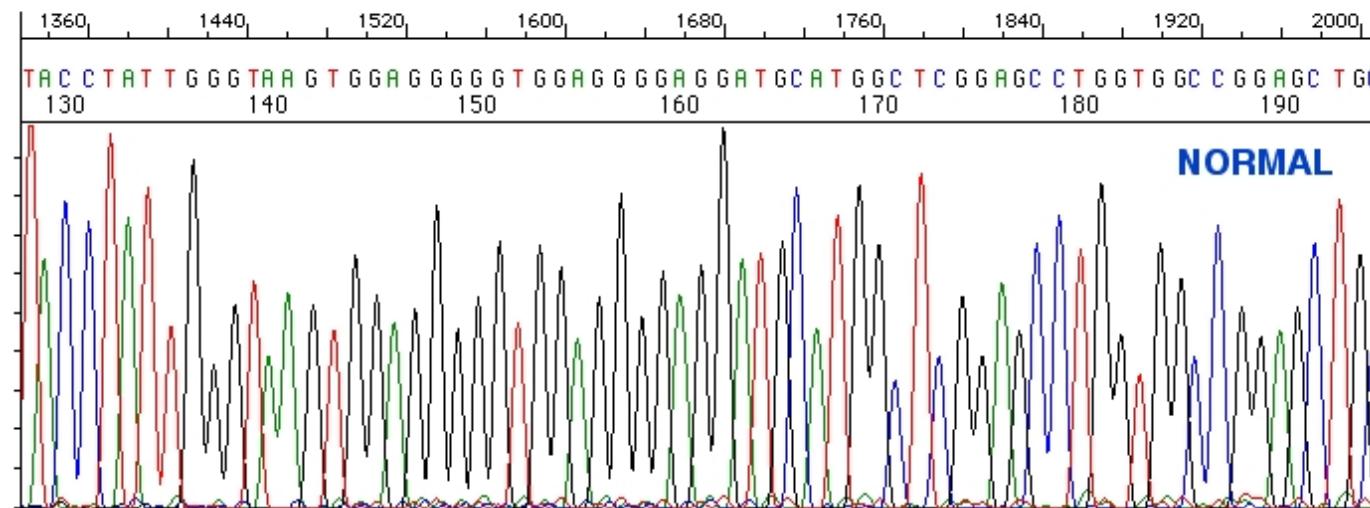
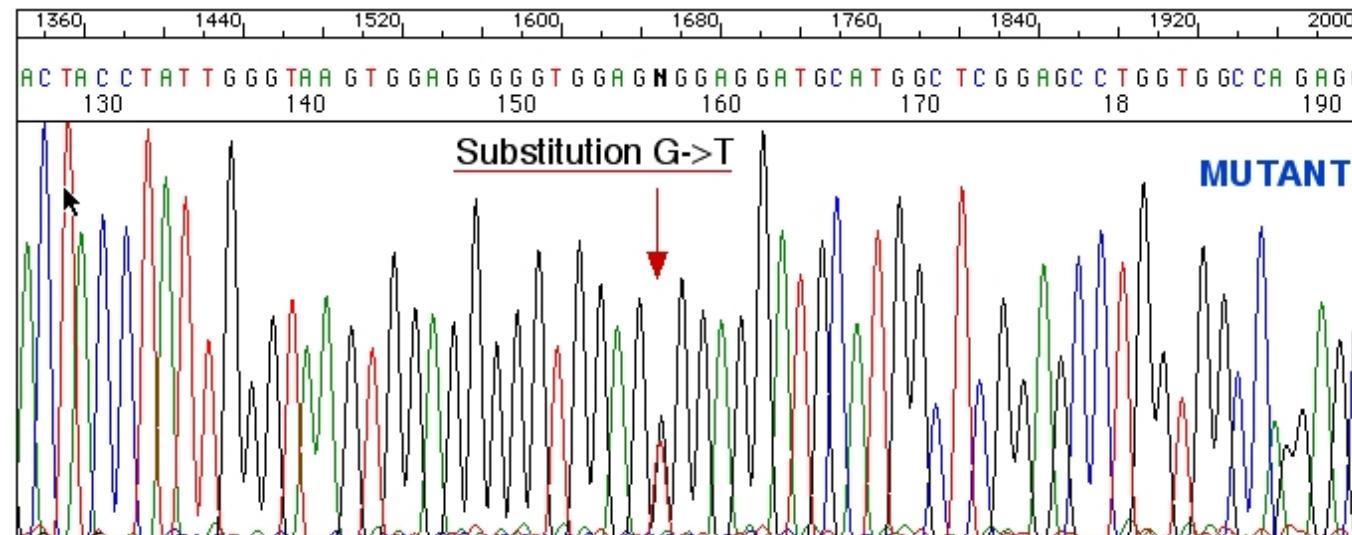
Gel electrophoresis



(Andy Vierstraete 1999)

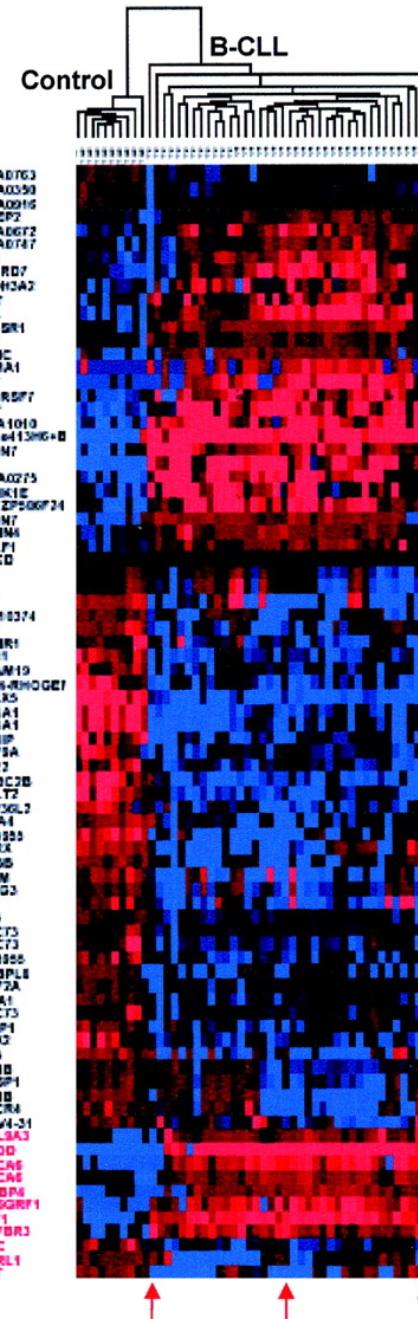
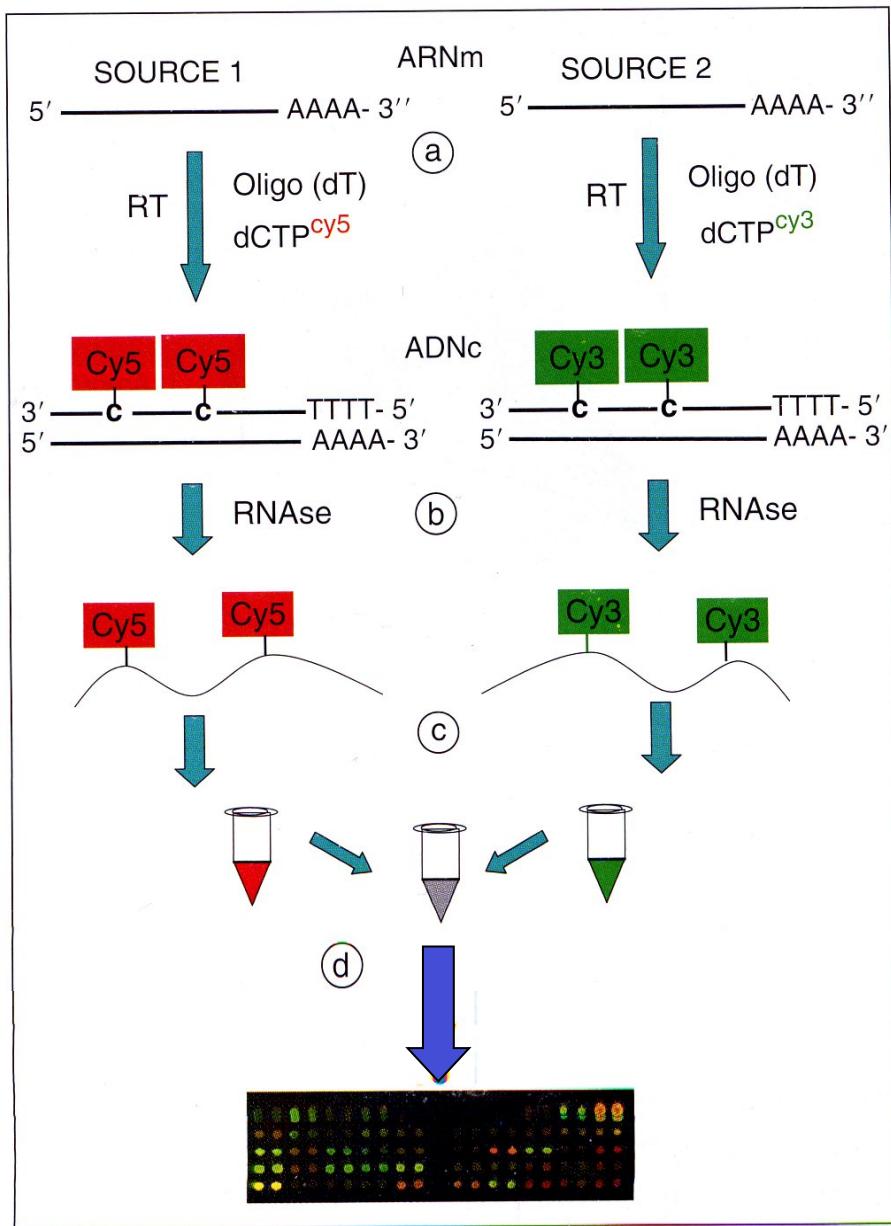
5.3. Séquençage (suite)

Application : détection de délétions / mutations



5.4. Puces à ADN (DNA chips, microarrays)

- . Petite surface solide (silicium, verre, plastique) sur laquelle un très grand nombre de **sondes** ont été fixées de manière ordonnée
- . Hybridation des **sondes** (oligos ou cDNA) à des **cibles marquées**
- . Analyse informatique des signaux
- . Avantages: rapidité, précision, automatisation, grande capacité d'analyse
- . Applications :
 - étude de l'expression des gènes
 - détection de mutations, de polymorphismes, de remaniements chromosomiques (**CGH array**)



Identification des gènes différentiellement exprimés dans les leucémies B-CLL et les lymphocytes B normaux