

Pr T.Levade	UE 1 : GÉNOME (TECHNIQUES)	10/10/2016
-------------	----------------------------	------------

Étudier les gènes ou leur expression : deux types d'acides nucléiques selon lesquels, les moyens diffèrent.  
Sur les ARN, précautions.

## 1) Techniques générales

### 1.1 Matériel biologique

L'ADN n'est présent que ds les cellules qui ont un noyau car présent ds noyau et mitochondrie.

Toutes les cellules ont du corps ont un noyau sauf les hématies. **Il faut des cellules nucléées pour avoir de l'ADN.** L'ADN est une mol stable (résiste aux var de température, au temps).

*Comment isoler l'ADN nucléaire ?*

Ds le noyau, l'ADN est protégé par des protéines : les histones. Pour y avoir accès, il faut casser les cel souvent par des **solutions hypotoniques** (=qui font éclater les cel) + des **détrangers** pour favoriser la lyse. Pour se débarrasser, des histones, on ajoute une protéase (=enzyme qui hydrolyse les protéines) : la **protéinase K**. => Libération de l'ADN.

*Quelle quantité peut on obtenir ?*

Il y a **6 picogrammes d'ADN par noyau**. Dans **1 ml de sang, on a accès à 30 µg d'ADN** (amplement suffisant).

L'ADN est hydrosoluble.

Pour les ARN, c'est différent. L'ARN est **fragile** car il peut être **dégradé par des enzymes : ribonucléases (Rnase)**. On retrouve ces enzymes partout (sur les mains), elles sont très actives, et résistantes aux traitements qui pourraient les altérer. => il faut prendre des précautions pour ne pas laisser agir ces Rnase sur l'ARN isolé.

On s'intéresse principalement aux ARNm : acide nucléique monocaténaire, très fragile, pas isolé par des protéines. On les obtient en cassant les cel (**détrangers + protéinase** pour enlever des protéines et parfois **isotiocianate de guanidinium**) en présence d'inhibiteur des Rnases.

*Comment isoler les acides nucléiques des autres constituants cellulaires ?*

=> Techniques d'extraction des acides nucléiques.

### 1.2 Extraction

Les acides nucléiques sont **hydrosolubles**, on peut se débarrasser des autres protéines dans un autre solvant. **Solubilité différentielle des acides nucléiques** (solubles ds l'eau), et des molécules contaminantes entre **deux phases non miscibles**.

- On utilisait pendant des années le **phenol** => phase phénolique inférieure (contaminants)  
=>phase aqueuse supérieure (acides nucléiques)

*les protéines sont parfois dénaturées à l'interface. Mais dépôt de traces de phénol, donc on faisait une 2ème extraction => chloroforme*

- Certains faisaient l'extraction avec **l'isobutanol** : pour solution aqueuse d'un acide nucléique marqué par un agent intercalant (**Bromure d'éthidium**). => L'isobutanol extrait le **Bromure d'éthidium (phase supérieure)** tandis que l'acide nucléique sera en phase aqueuse.

#### 1.1. Matériel biologique

##### . Préparation de l'ADN

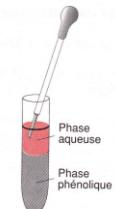
ADN nucléaire : 6 pg/noyau

(**1 ml de sang = 5.10<sup>6</sup> 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<sub>260nm</sub> correspond à 50 µg/ml (double brin)**

**1,8 < Rapport DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> < 2 si ADN pur**

### 1.3 Précipitation

- Mélange avec la solution aqueuse de l'éthanol (95°), **2,5 fois volume de solution aqueuse, force ionique** (des sels ioniques), **éthanol à froid (-20 à -70 °C)** => on obtient des filaments blancs 'méduse'

**- Ou l'isopropanol**

=> On obtient au fond du tube un **acide nucléique précipité**. On va rincer cet ADN avec une solution d'éthanol moins concentré. *On peut ajouter de l'eau (tampon) sur l'ADN pour le redissoudre dans un petit volume pour le conserver.*

=> Généralement, on veut avoir une estimation de la concentration de cet acide nucléique, pour cela on va le doser.

### 1.4 Dosage

Les bases des acides nucléiques absorbent à **260nm**.

=> Pour de l'ADN bicatenaire : **1 unité de DO(260nm) = 50 µg/ml**

- Degré de pureté : les **protéines** absorbent à **280 nm**. Donc on va faire une double lecture optique, pour voir s'il reste des protéines dans le mélange.

**Rapport DO(260)/DO(280) => on considère l'ADN pur si rapport compris entre 1,8 et 2**

## 1.5 Méthodes de séparation

### 1.5.1 Électrophorèse

- Technique qui permet de séparer des mol (solutés), en les soumettant à **un champ électrique**, et en étudiant leur **déplacement**.  
*Qu'est ce qui influence le déplacement des acides nucléiques ?*

**Les AN sont chargés négativement (car phosphate chargé négativement), donc se déplacent vers l'anode (pôle +).**

- Ce qui influence le déplacement, c'est **la taille de la molécule** (longueur d'un AN = nbr de nucléotides), et **la concentration de l'agent qui permet de créer le gel**. En biomol, 2 types :

- gel constitué **d'agarose** : de **200 à 20 000 pb selon concentration en agarose**
- gel constitué de **polyacrylamide** : **10 à 800 pb**.

Ils permettent de séparer des fragments qui n'ont pas la même taille.

=> **Plus un fragment d'ADN est petit, plus il se déplace** => relation linéaire, sur une échelle semi-logarithmique. *On dépose aussi un fragment étalon de taille parfaitement connue. L'anode est en bas du schéma, la cathode en haut donc les AN migrent vers le bas.*

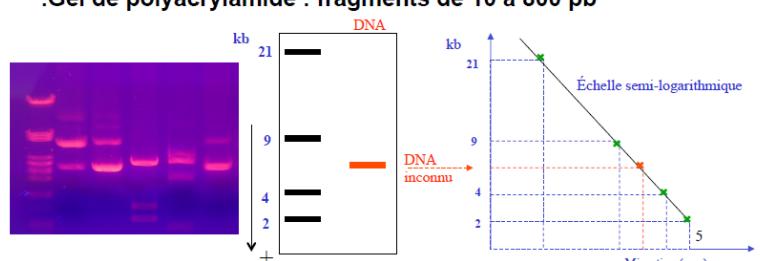
*Comment visualiser la migration ?*

- Si on dépose des AN, on ne voit rien sur le gel. Pour les visualiser, on utilise un agent intercalant : **le Bromure d'Ethidium**, qui lorsque lié à un ADN, émet **un signal fluorescent sous UV**.

- Si on souhaite récupérer un fragment d'AN débarrassé de son agent intercalant, il faut après excision du fragment, **extraire le Bromure d'éthidium avec de l'isobutanol**.

- **L'électrophorèse en champ pulsé** : application très particulière, pour analyser de **très grands fragments**. Il ne faut pas casser les cel, mais déposer dans un **gel d'agarose**, directement les **noyaux** des cellules isolées avec précaution. Pour séparer ces grds fragments d'ADN, il faut faire l'électrophorèse en champ pulsé.

Variations de sens du champ => **on peut isoler jusqu'à 1 millions de pb.**



### 1.5.2 Ultracentrifugation

**Avant :** pour obtenir des AN purifiés. Des AN de plasmides. **Centrifugation de sémination.** Les AN se déplacent dans un mélange avec variations de densité.

- Les agents utilisés pour générer gradient de densité :
  - chlorure de césum CICs** : centrifugation isopicnique
  - gradient de saccharose** : préformé

- **Tout au fond du tube: ARN (plus dense que l'ADN), une bande intermédiaire : ADN chromosomique de la bactérie, une bande supérieure : ADN du plasmide selon qu'il soit super enroulé ou relâché.**

On peut isoler les plasmides sous forme pure.

**MAIS** Tech très longue, plus utilisée aujourd'hui.

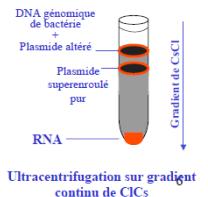
### 1.5. Méthodes de séparation (suite)

#### 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

### 1.5.3 Chromatographie

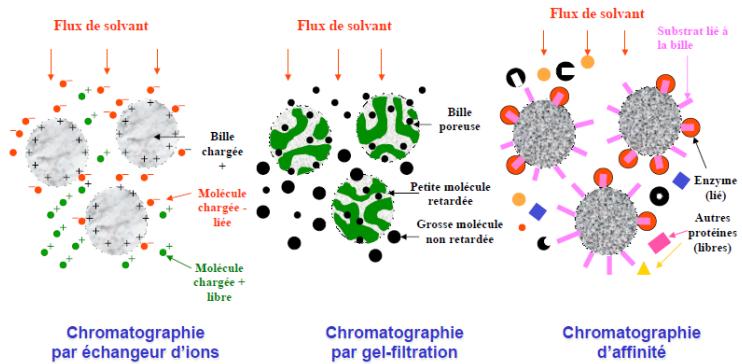
3 grp types de chromatographie :

- **par échangeur d'ions** => sépare **selon la charge de mol** (ionisation) : si on greffe sur support des groupements chargés positivement, lorsqu'on introduit un soluté, ceux portant des charges positives vont restés accrochés au support, tandis que ceux portant des chargés négatives vont être élués.
- **par gel-filtration (ou exclusion)** => sépare les mol **selon leur taille**. Le gel constituant la phase stationnaire est fait d'un réseau de billes contenant soit des pores de petits diam, soit de grande diam. Les mol de grande taille, ne peuvent s'insérer dans le réseau et vont donc traverser la colonne très rapidement => ils sont élués en premier. Les mol de petites tailles s'insinuent dans les pores du réseau et sont donc retardés.
- **par affinité** => sépare **selon l'affinité qui pourrait exister entre le soluté, et un composé greffé sur la phase stationnaire**. Ex : on fixe sur les billes du support une mol qui sert de substrat à une enzyme. Si on dispose tout une série de protéine, seules les protéines enzymatiques reconnaissant spécifiquement le substrat pourront se fixer aux billes, les autres seront éluées. Ex : Anticorps pour antigène donné ou entre une lectine et un sucre donné.

Tous ces modes de chromato sont utilisables :

- **affinité** => celui couramment utilisé : pr isoler les **ARNm matures**, sont des acides nucléiques qui ont en 3' une queue polyA. Si on souhaite isoler spécifiquement seulement les ARNm matures, on prépare une phase stationnaire sur lequel est greffé un poly-U ou oligo-dT. Seules les ARNm portant la queue polyA seront retenus **par cette chromato**.
- **Gel filtration** => pour se débarrasser des toutes petites molécules. Par ex, d'un coté protéines/AN et de l'autre des nucléotides libres (de petites tailles).
- **Échangeur d'ions** => éliminer petites molécules chargées.
- **HPLC** : haute pression chromatographie liquide. Petits sys de chromato simple, les AN se fixent au gel phase stationnaire, et après élution on obtient des AN plasmidiques purs;

#### Principe de méthodes chromatographiques



## 1.6 Synthèse d'oligonucléotides

Pour obtenir, un AN dont on connaît parfaitement la séquence. Facile à synthétiser.

## 2) Outils enzymatiques

### 2.1 Enzyme de restriction (=endonucléase de restriction)

#### 2. Outils enzymatiques

##### 2.1. Enzymes de restriction

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

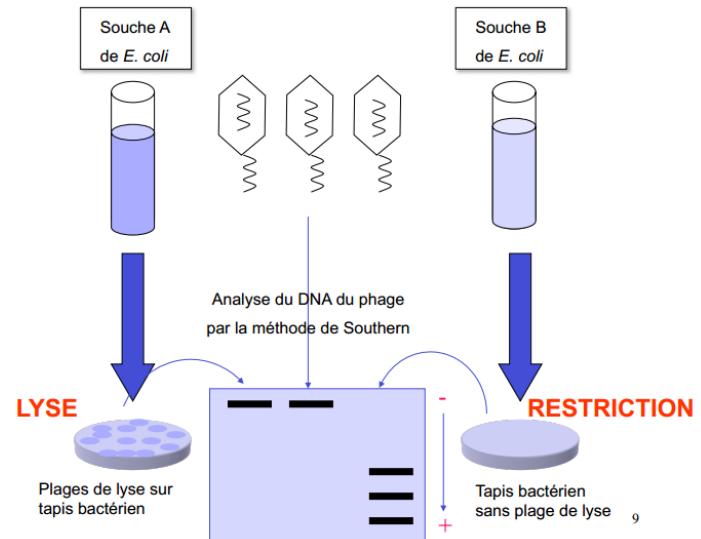
- . **Phénomène de restriction** (système de défense de la bactérie)

- . **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)



- Le phage peut être infectieux ou bien non infectieux si une fois pénétré ds la bactérie, il devient silencieux (intégration de l'ADN du phage ds l'adn bactérien et à l'occasion de chgt de conditions, le phage peut se réveiller). Phage (=Adn dans capsule).

- **Explications de la non lyse des bactéries (conséquence du phénomène de restriction):**

- **Expérience** : solution de **bactériophage** appliquée sur **deux souches bactériennes différentes** => **tapis bactérien** après prolifération dans boîte de Pétri avec :

- Dans la souche A => trous dans le tapis bactérien = **Plages de lyse induites par le bactériophage** (infectieux)
- Dans la souche B => pas de lyse, **résistance à l'infection du bactériophage**.

=> **Analyse de l'ADN isolé des phages prélevé dans chacun des milieux :**

- ADN issu de la lyse = **Une seule bande d'ADN** identique aux phages natifs
- ADN de la souche B (ayant résisté) = plusieurs bandes => **Un ADN fragmenté** => Dans la souche résistante, les bactéries ont produit des enzymes qui ont dégradé l'ADN du phage pour s'en protéger. D'où le nom d'**enzymes de restriction**.

- Une **enzyme de restriction** est une **endonucléase** n'agissant **QUE sur de l'ADN BICATÉNAIRE**. Le coupent en sites particuliers.

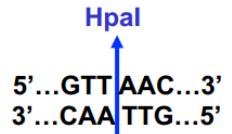
- Voir nomenclature pour **NOMMAGE**

- Ces enzymes sont divisées en 3 grp selon la manière dont elles coupent dont es enzymes de type II :

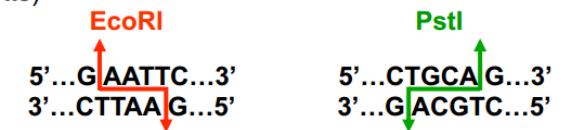
**enzyme de type II** : reconnaissent une séquence donnée de l'ADN et coupent cette séquence. Elles reconnaissent des **palindromes** (=séquence que l'on peut lire dans les deux sens, ex : RADAR/ Ds l'ADN, **séquence nucléotidique identique sur les deux brins mais lu respectivement dans le sens 5'-3'=> symétrie centrale**)=> séquence palindromique à 4,5,6, lettres...

##### 2.1. Enzymes de restriction (suite)

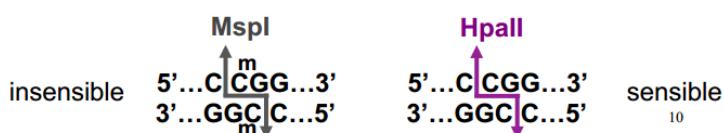
- Bouts francs



- Bouts cohésifs (protusifs, collants, en baïonnette)



- **Isoschizomères** et méthylation



- L'enzyme coupe la séquence reconnue sous **deux types de coupures** :

- **Bouts francs/droits** : coupure droite/franche. Ex : *HpaI*
- **Extrémités en baïonnettes** : **brin protrusifs/cohésifs/collants** => un brin dépasse de l'autre. Ex : *EcoRI*. MAIS ces brins peuvent se ré-hybrider, se recoller si on les rapproche.

- Les **Isoschizomères** : des **endonucléases de restriction** qui coupent l'ADN de la même manière mais qui proviennent de bactéries différentes. **Reconnaissent la MÊME séquence et la coupent de la MÊME manière.**

*Ex : Mspl et Hpall originaires de différentes bactéries reconnaissent le même palindrome CCGG, et de la même manière (en baionette).*

Parmi ces couples d'isoschizomères, certains se distinguent par le fait qu'ils peuvent cliver la séquence qu'elle soit ou non méthylée, tandis que d'autres ne peuvent cliver l'ADN s'il est méthylé. Certaines bases peuvent être méthylées (c les Cytosine qui appartiennent au doublet CG) => moyen de réguler l'expression génique à travers la transcription car la méthylation freine généralement la transcription.

*Ex : Mspl coupe une séquence avec C méthylée => elle est INSENSIBLE à la méthylation*

*Hpall ne peut pas couper une séquence méthylée => elle est SENSIBLE à la méthylation*

=>On peut donc étudier le statut de méthylation d'un gène, statut de transcriptibilité d'un gène, en le soumettant à une enzyme endonucléase sensible (*si elle coupe, la séquence n'est pas méthylée, si elle ne coupe pas la séquence est méthylée*).

DÉVELOPPEMENT EXEMPLAIRE : Ds chaque cellule chez les femelles (XX), un chromosome X est inactivé pour ne laisser qu'un seul gène X actif (=égalité d'expression avec le mâle). Ce phénomène d'inactivation a lieu à un stade très précoce. Cela repose sur la méthylation des gènes.

**Souvent, MÉTHYLATION = INACTIVATION (non transcriptible).** Les femelles sont des chimères car la moitié des cellules ont inactivé le chrom X venant du père, et l'autre moitié ont inactivé le chrom X venant de la mère => génotypes différents ds les cellules. **Mais existe aussi des distributions déséquilibrées.**

- Si mutation sur un des chromo X, la femelle peut ou non exprimer le gène muté => les femmes sont souvent porteuses des maladies mais ne l'expriment pas car le gène muté est compensé par l'expression du gène non muté dans la moitié des autres cellules qui expriment l'autre chrom X et inactivent le chrom X muté. **Problème si la femme inactive la majorité de ses chromo X non muté !!**

## 2.2 DNA polymérase

### 2.2.1 DNA polymérase I

- Au labo **DNApol I** est la plus utilisée, isolée à partir de bactéries.

- Enzyme qui utilise des substrats : les **dNTP (desoxyribonucléoside-tri-phosphate)**. Elle les rajoute à l'extrémité 3' d'un brin d'acide nucléique.

- Pour synthétiser l'ADN, elles utilisent **un modèle => le brin matrice**. Elles « créent » à chaque fois un nuléoside mono-phosphate en 3'. Mais nécessitent une amorce (primer) pour commencer à « tricoter ».

- **Toujours dans le sens 5'-3' (sens de polymérisation)**  
Elles savent aussi dégrader les acides nucléiques à partir des extrémités => **activité exonucléasique ds les deux sens (5'=>3'), et en marche arrière (3'=>5')** aussi dit « proof reading ».

## 2.2. DNA polymérases

### 2.2.1.DNA polymérase I (*E. coli*)

- **activités :**
  - DNA polymérasique 5'→3'
  - exonucléasique 3'→5' et 5'→3'

- **fragment de Klenow** : pas d'activité exonucléasique 5'→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'→3'

## 2.3. RNA polymérases

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

**Le fragment de Klenow :** produit en coupant la DNAPol I. A perdu l'activité exonucléasique (5'=>3').  
**DNAPol IV** a les même prop.

**2.2.3 Terminal transférase :** ajoute des nucléotides à l'extrémité 3'. Elle ne rajoute qu'à cette extrémité et seulement ce qu'on lui donne dans le milieu. Si que des dTTP, elle va ajouter à l'extrémité 3' des dTTP sans considération du brin complémentaire => **Elle N'UTILISE PAS DE MATRICE.**

**2.2.4 Transcriptase inverse (rérovirus) ou rétrotranscriptase :** permet de synthétiser de l'ADN en prenant comme matrice de l'ARN => L'enzyme retrouvée chez les rérovirus, leur permet de passer de l'ARN (=leur matériel génétique) à de l'ADN.

**La Transcriptase Inverse :**

=> Synthèse d'un brin d'ADN sous forme d'ADN copie complémentaire du brin d'ARN génomique original => cDNA (ADN complémentaire) en utilisant des dNTP. Elle a aussi une activité de **Ribonucléase H** pour dégrader après synthèse du cDNA, le brin de RNA matrice restant.

## 2.3 RNA polymérases

- enzymes qui synthétisent des **brins d'ARN** donc substrats **NTP (ribonucléosides-triphosphate)** ds le sens **5'=>3'**.
- Elles prennent comme **matrice un DNA monobrin et synthétisent un RNA complémentaire**.
- Elles ne peuvent transcrire QUE si l'ADN porte la région sur laquelle elles peuvent se fixer

=> **région promotrice spécifique du RNA pol**

*Si ADN porte le promoteur d'un gène isolé du phage T4, on ne peut utiliser que l'ARN polymérase de ce phage T4 pour transcrire le dit ADN T4 => correspondance nécessaire entre séquence promotrice et RNA polymérase.*

**2.4 Ligases :** enzyme capable de reformer les liaisons phosphodiester entre les nucléosides. Entre un 3' libre et un 5' phosphate. Capable de recoller des brins d'ADN.  
**!! ATTENTION : on ne peut pas utiliser n'importe quelle ligase selon le type de coupure (droite, en baionette) !!**

## 2.5 Nucléases

### 2.5.1 DNases

- La **desoxyribonucléase DNase I coupe** l'ADN qu'il soit **monocaténaire ou bicaténaire**. Selon sa **concentration**, elle va couper un brin ou les deux brins de l'ADN.
- Si on l'utilise de façon très diluée, elle coupe cet ADN presque tjr au même endroit => **sites hyperpensibles** à l'action de la Dnase. Ce st des régions de l'ADN non protégées par différents facteurs, et donc activement transcris !!
- **Nucléase S1** : agit seulement sur l'ADN (ou l'ARN) **MONOCATÉNAIRE (simple brin)**. Elle reconnaît très précisément l'état monocaténaire.

### 2.5.2 RNases

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

### 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)

- **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  $\gamma$  d'un ATP en 5' d'un polynucléotide

#### 2.6.2. Phosphatase alcaline

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

- **RNase H** : H comme **hybride**. Cette ribonucléase reconnaît spécifiquement les hybrides d'acides nucléiques => **UN ARN apparié à un ADN**. Elle va dégrader l'ARN présent dans cette hybridation. Prop accessoire de la reverse-transcriptase.

## 2.6 Autres enzymes

**2.6.1 T4 polynucléotide kinase** : enzyme qui **KINASE** = greffe un groupement phosphate sur un substrat, phosphoryle un acide nucléique. **Utilisée pour MARQUER l'extrémité 5'** d'un polynucléotide par greffe de phosphate. Le donneur du phosphate est une mol d'ATP qui donne son phosphate gamma **P(32)**.

Si l'extrémité porte déjà un P, cette réaction se résume par un échange entre le P présent, et le P apporté par l'ATP.

**2.6.2 Phosphatase alcaline** : enzyme phosphatase (=retire un grp phosphate), alcaline = pH optimum basique. Utilisé pour éliminer un phosphate en 5' sur ADN, ARN ou nucléotides.

### Application: préparation de cDNA

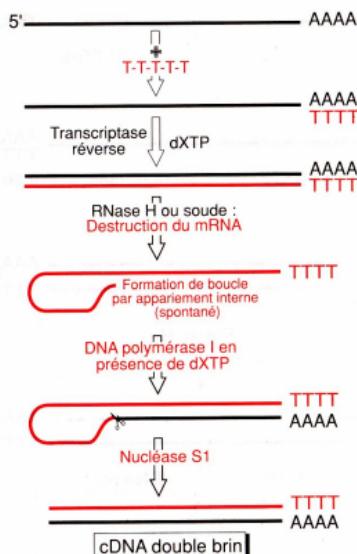


Figure 25-3 La technique originelle de synthèse de cDNA à partir de mRNA

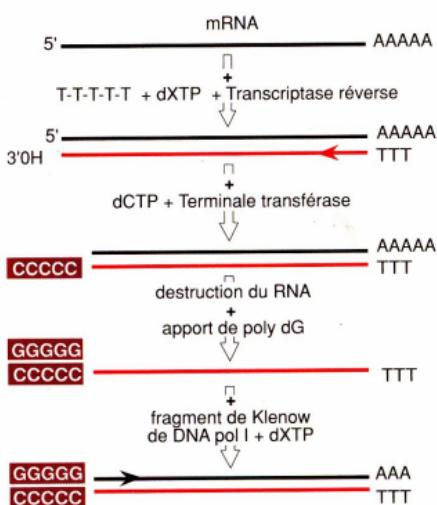


Figure 25-4 Synthèse de cDNA « copies entières » par la technique des queues simples (tailing)

- Pour examiner un ARNm (fragile), on peut convertir ces ARN en cDNA avant, par une réverse-transcriptase qui utilise une amorce : **oligonucléotide -oligoDT**, qui va s'apparier avec la queue polyA.

- Une fois qu'on a la copie DNA complémentaire, on détruit le RNA initial par une **RNase**. Sur le brin de DNAc restant, on ajoute une extension ('technique des queues simples'), par ex une queue de C. **Comment? Par la terminal transférase** (en extrémité 3' elle greffe que des C)

- On ajoute un **oligonucléotide dG** qui s'apparie avec l'extension C du DNAc, et qui sert d'amorce pour que la DNApol synthétise un DNA complémentaire du DNAc => **on a fabriqué du DNA bicaténaire à partir d'ARNm**.

## 3) Hybridation et sondes

### 3.1 Température de fusion : Tm

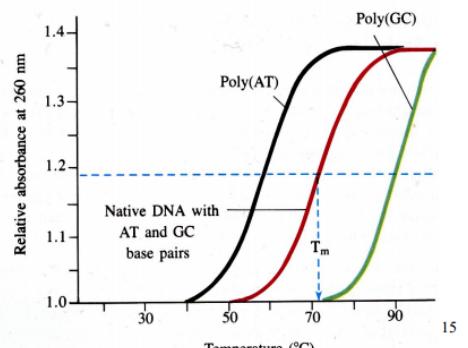
- On place en solution aqueuse une solution de DNA bicaténaire. **Elle est capable d'absorber la lumière à 260nm(acides nucléiques).**

- On élève la température de façon progressive. Autour de 50°C, il y a une élévation de la DO(=absorbance). Le plateau final est atteint autour de 95°C.

### 3.1. Température de fusion : Tm

. Phénomène de fusion : dénaturation

. Effet hyperchrome



Cette élévation de la DO est l'effet **hyperchrome** car un ADN absorbe plus à l'état monocaténaire qu'à l'état bicateinaire.

- La demi-dénaturation ou valeur de la température qui correspond au pt d'inflexion est le Tm.

### 3.1. Température de fusion : Tm (suite)

**Facteurs influençant le Tm :**

- La stabilité de l'ADN dépend de sa **composition en bases** (si bcp de A=T liés 2 fois par LH moins dur à rompre donc Tm plus petit, inversement liaison G=C en 3LH augmente le Tm)

S'il existe des mis-appariements («mismatches»), on fragilise le DNA donc le Tm est légèrement diminué

- Selon la **concentration en sel**, le Tm varie => plus la force ionique est faible (dilué, faible c en sels <1M), plus le Tm est bas car on augmente la fragilité. Si la force ionique est forte (c en sels concentré), le Tm est plus élevé.

. 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**

Une solution est d'autant plus stringente qu'elle déstabilise la double hélice, donc qu'elle abaisse le Tm (ex : solution saline diluée => faible force ionique => fragilité augmentée)

## 3.2 Hybridation

Ré-association des brins dont les seq sont complémentaires => **spécifique**.

- On refroidit la solution de DNA portée à 95°C donc dénaturée :

- Si refroidissement **brutal** => le DNA reste **monocaténaire**
- Si refroidissement **lent** => le DNA devient **bicateinaire**, se **réhybride**.

Facteurs influençant l'hybridation :

- **COT** = Concentration des acides nucléiques \* temps donné à l'acide nucléique pour se réhybrider  
Correspond à la probabilité du DNA à se réhybrider plus ou moins vite.
- **La force ionique** : solutions salines faiblement concentrées = faible force ionique alors on déstabilise la double hélice de DNA et on s'oppose à l'hybridation (=très stringent). Si fortement concentré, on favorise l'hybridation

## 3.3 Notion de sonde

**Une sonde** = séq polynucléotidique complémentaire d'un ADN ou ARN avec laquelle elle s'hybride.

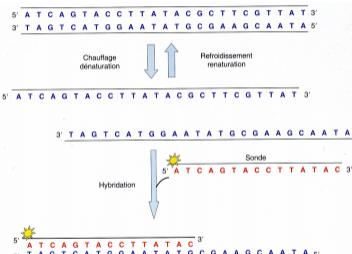
- Pour explorer le génome, on sépare les deux brins par chauffage (dénaturation), et on insère une sonde **marquée** qui s'hybride avec le brin monocaténaire que l'on veut suivre par complémentarité.

Cela peut être de l'ADN, ADNc ou oligonucléotide, ARN ou fragment (ribosonde)

### 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

#### 3.4.1 Par quoi ?

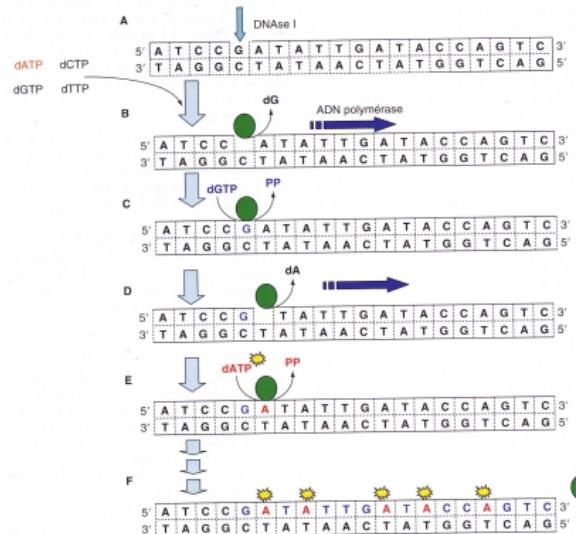
- On peut marquer l'oligonucléotide avec le **Phosphore 32 radioactif**, mais demi-vie **courte**, trop éphémère.  
Puis on utilisait des isotopes intermédiaires : P(33), S(35) => **radioactif**
- Puis on a développé des **sondes froides** (fluorescentes, fluorogéniques, luminescentes, biotine,...) non dangereuses car **non radioactives**.

#### 3.4.2 Comment ?

- **Translation de coupe (nick translation)** : on utilise une enzyme qui coupe l'ADN puis une qui synthétise l'ADN.
  - D'abord on utilise la **DNAse I** dilué pr que de manières aléatoires elle fasse des coupures si possible sur un seul brin.
  - la **DNApolymérase I** est utilisée en conservant son act **exonucléasique 5'-3'**, pour qu'elle s'insère ds le trou, ajoute une base, puis coupe par son action exonucléasique le nucléoside suivant, et introduit juste après, une base identique à la base éliminée **SAUF QU'ELLE SERA MARQUÉE** (*par ex : par le P32 sur le Pgama*)

#### 3.4.2. Comment

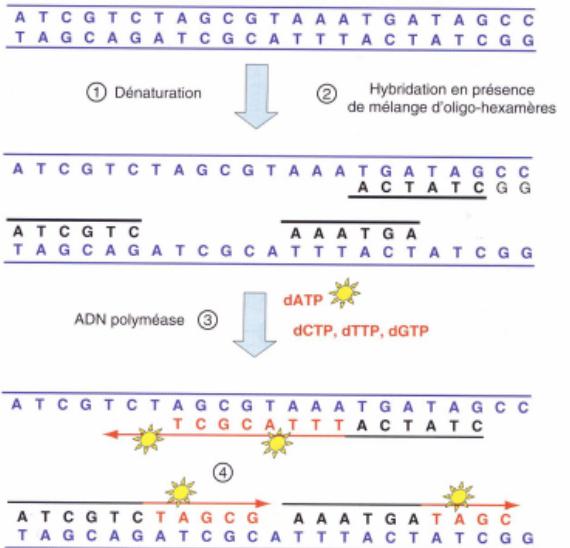
##### - translation de coupe (nick translation)



#### - avec hexamères aléatoires (multiamorçage aléatoire) :

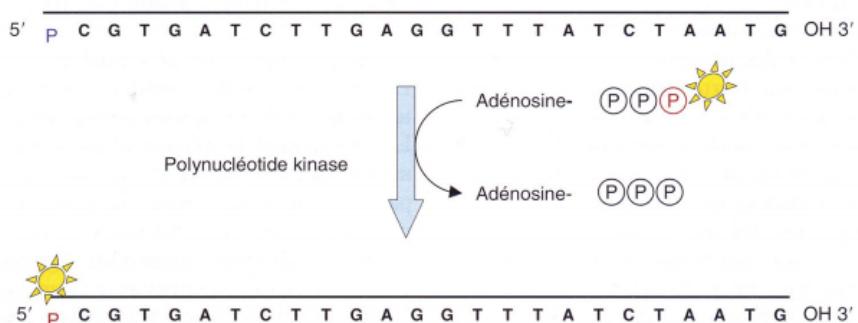
- On utilise seulement une DNApolymérase.
- On donne des amorces très courtes et non marquées dont on est certain qu'elles pourront s'apparier avec l'ADN. Ce sont des **hexamères** qui couvrent toutes les possibilités d'association entre 6 nucléotides consécutifs soit  $4^6$  possibilités.
- pas besoin de l'act exonucléasique. On peut utiliser la T4pol ou fragment de klenow pour ensuite synthétiser le brin d'ADN en utilisant les nucléotides marqués, à partir des « amorces d'hexamères » fixés.

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



#### - T4 polynucléotide kinase

Le Phosphate déjà placé est remplacé par un phosphate marqué à l'extrémité 5'.



## - ribosondes

### - Ribosondes

RNApol agit sur DNA

- ADN qui code pour la sonde est déjà incorporé dans un vecteur (ex : plasmide).

*En rouge : ADN bicaténaire dont on aimerait obtenir une ribosome.*

1) D'abord on le linéarise le plasmide en ouvrant le cercle par une **enzyme de restriction**.

2) Il faut une **région promotrice** pour permettre la transcription par la RNApol: *ici SP6*.

- Donc on doit utiliser la RNApol spécifique de SP6 (point noir). La RNApol se lie au promoteur. Elle commence la transcription du brin d'ADN en ARN. A partir d'une mol d'ADN, on transcrit plusieurs copies des ribosondes (plusieurs RNApol transcrivent simultanément).

Ensuite il faut purifier le mélange pour obtenir la ribosome radiomarquée.

## 4) PCR

- Méthode dvpée pr synthétiser en abondance une section du génome double brin dont on avait besoin.

*En effet, les chercheurs manquaient cruellement de matériel génétique pour l'expérimentation, ils avaient du mal à obtenir des acides nucléiques.*

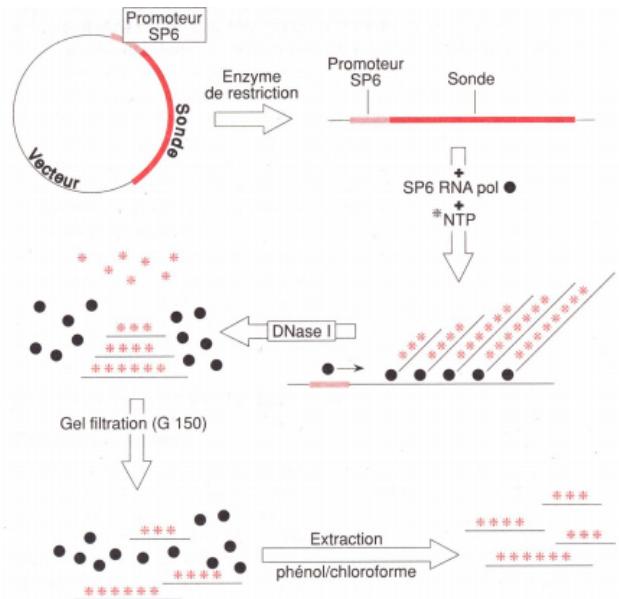
Cette méthode nécessite :

- Un DNA double brin qui abrite la zone d'intérêt à produire en masse
- La synthèse en amont de **2 amorces de 20 nucléotides** complémentaires des bornes de la séquence d'intérêt de la mol l'ADN
- Une DNA polymérase (Outil enzymatique) qui va prolonger les amorces
- De **nucléotides (dNTP)** substrats de la DNA polymérase

Pour produire en masse une région que l'on souhaite analyser à partir de DNA bicaténaire :

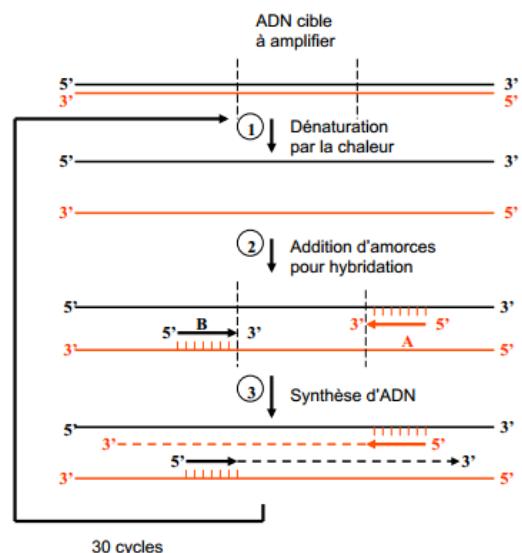
**1) Étape de dénaturation (fusion/séparation des brins)** par la chaleur, élévation de température (jusqu'à 90°)

**2) Étape d'hybridation des amorces** : On se place dans des conditions où les amorces (=oligoNT courts) peuvent s'apparier avec leur brin complémentaire. Il y a une amorce par brin monocaténaire, chacune marquant une borne de la séquence. Pour être dans ces conditions, il faut ABAISSEZ la température en dessous du Tm des deux petites amorces pour permettre leur appariement avec la mol de DNA.



## 4. PCR

### Amplification élective in vitro (Polymerase chain reaction ou PCR)



### 3) Etape de synthèse d'ADN par la DNApolymérase (Elongation) :

A partir de chacune des amores, la DNA polymérase allonge le DNA en 5' → 3' par complémentarité avec la matrice sur les deux brins (deux amores antiparallèles). Cela peut se poursuivre très loin en direction 3' selon le temps d'action de la DNApol => **La partie 3' des brins synthétisés lors de la PCR est très variable**  
*On a donc doublé la quantité d'ADN : Si on le fait n fois, à chaque fois on double la quantité d'ADN => au bout de 30 cycles, on a multiplié considérablement la qté d'ADN*

## 4.1 Principes

- **DNApolymérase thermo-résistante** : chaque cycle de la PCR est subdivisé en **3 phases avec des variations importantes de température** (90° pour dénaturation initiale, puis on abaisse sous le Tm des amores,...). On doit donc utiliser des DNApolymérases thermo-résistante afin qu'elles ne soient pas dégradées par ces variations brusques de température au cours de la PCR., *On les prélève sur des bactéries habituées aux fortes températures (Thermus Aquaticus) => DNApol fonctionne à haute température 90°.*

- **Bon rendement, méthode puissante** : après N cycles,  $2^N$  exemplaires du fragment d'ADN.  
 Si 25/30 cycles, on multiplie presque par 100 000 la qté d'ADN initiale que l'on souhaite amplifier.

- **Méthode très spécifique** : on n'amplifie que la séquence définie ENTRE les deux amores sélectionnées (bornes).

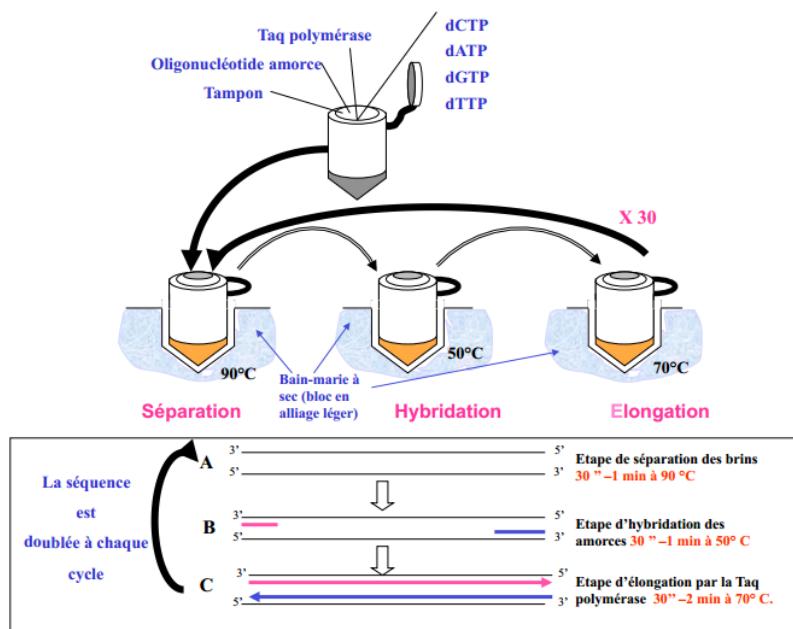
### 4.1. Principes

. **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)

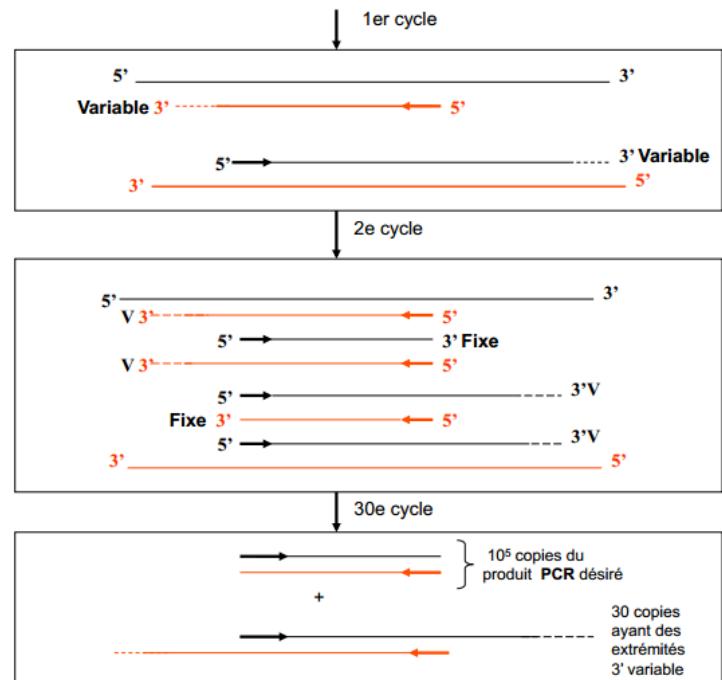
**N copies à extrémité variable**



*Au cours de la phase de synthèse/d'elongation, on peut déjà commencer à ré-elever la température pour anticiper sur l'étape de dénaturation du prochain cycle => gain de temps/énergie.  
 (Pas de risque de dénaturation des amores, car le Tm s'est élevé au cours de l'elongation du brin par la DNApol.)*

- Au cours du 1<sup>er</sup> cycle, l'extrémité 3' est **VARIABLE** car rien n'est présent pour indiquer l'arrêt en un point précis de la DNAPol.
- Au cours de tous les cycles suivants, les brins originaux matrices subissent la même étape que lors du 1<sup>er</sup> cycle (2 amores se fixent aux bornes et élonguent en 3').
- En revanche, à chaque cycle, tous les monobrins (car dénaturés) néosynthétisés au cours des cycles antérieurs **Amorce → 3' variable** subissent la **fixation de l'autre amorce** (qui vient placer la borne terminale 3') en sens inverse, et qui sert de point de départ à la DNA polymérase à la **synthèse d'un brin d'ADN parfaitement délimité en 5' et 3'.**

Ce n'est donc qu'à partir du 2ème cycle, que l'on a les séquences délimitées amplifiées que l'on veut.



## 4.2 Limites

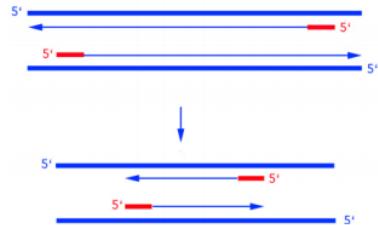
- **Taille des fragments obtenus** : les fragments obtenus par la DNAPol (**amplicons**) sont de petites tailles (<1500/2000 pb).
- **Besoin d'information minimal** sur la séquence à amplifier pour synthétiser la séquence des **amorces** qui constituent les bornes de la seq à amplifier.
- **la DNAPolymérase n'est pas parfaitement fiable**. Elle commet quelques erreurs aléatoires (proof reading imparfaite).

## 4.2. Limites

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

## 4.3. Applications

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



28

- **Les amplifications parasites** : produits d'amplifications non attendus. On s'en rend compte car sur électrophorèse on a des fragments en plus (moins **abondants**) des amplicons.

**Origine** : si les amores ne se sont pas hybrides de façon parfaitement complémentaire. On peut corriger cette anomalie en élevant la température (on augmente la stringence).

**PCR nichée (nested PCR)** : On fait une 2ème PCR en mettant des nouvelles amores qui délimitent une seq plus intérieure.

- **Les Contaminations** : si on travaille mal, on obtient des produits d'amplification précédentes. L'échantillon est contaminé par un ADN qui va devenir substrat de la PCR.

**Depistage** : Il faut utiliser un tube dans lequel on ne place pas la solution d'ADN que l'on souhaite amplifier mais plutôt tous les ingrédients (amores, dNTP,...) et on réalise une PCR sans ADN. C'est un **contrôle** puisque si on trouve des amplicons à l'issue de cette PCR, cela signifie que le milieu est contaminé par de l'ADN.

Règle de biologie moléculaire : Travail précautionneux, et schéma du laboratoire : trajet unidirectionnel de l'échantillon, pas d'aller-retours entre les salles du labo.

### 4.3 Applications

RT-PCR : d'abord une phase de **rétrotranscription (RT)** des ARN en cDNA puis PCR sur ce cDNA.

**Attention** : la PCR n'est pas une méthode quantitative (pertes,...).

=> Pour déduire la qté d'ADN initiale à partir de l'ADN obtenu par PCR, il faut utiliser des méthodes qui s'appuient sur la détection des produits d'amplification au début de leur phase de synthèse (en période exponentielle).

**PCR-quantitative (qPCR)** : examinent la production des amplicons. Méthodes de PCR en temps réel.

- Pour quantifier des transcrits ARN : on fait une PCR-quantitative après rétrotranscription en ADNc:

### RT-qPCR

## 5) Analyse du génome

- Si on dispose d'une seq nucléotidiques marquée s'hybridant avec une région donnée du génome, on a la possibilité de révéler ds le génome les régions qui s'apparent avec cette sonde.

- Concerne l'**ADN nucléaire** ou encore l'**ADN mitochondrial**

### 5.1 Southern blot

- On explore une région bien spécifique du génome à condition d'avoir la sonde complémentaire. Méthode d'hybridation.

1) On fragmente l'ADN à analyser car il est de très grande taille (mammifère). La fragmentation mécanique n'est pas suffisante => On utilise des **enzymes de restriction** pour couper les 3milliard de pb en grand nombre de fragments.

2) On sépare ensuite ces fragments en fonction de leur taille => électrophorèse classique

3) On dénature ces fragments qui sont bicaténaires, **directement dans le gel d'électrophorèse** => dénaturation sur place, *in situ*.

4) Il faut réaliser une pré-hybridation. En effet, *On ne peut pas faire d'hybridation de sonde directe dans le gel d'électrophorèse. Donc on applique un buvard sur le gel (une membrane), pour transférer l'ADN monocaténaire (car dénaturé) sur le buvard et réaliser l'hybridation sur le buvard => Phase de transfert de l'ADN sur support solide.*

MAIS L'ADN ne passe que sur une petite partie de la membrane du support solide. Si on ajoute la sonde, elle se fixerait dans toutes les zones libres et non dans la tache d'ADN donc... on apporte un ADN hétérologue (rien à voir avec celui analysé) qui va combler toutes les surfaces libres du support.

5) Maintenant, on peut ajouter la sonde qui s'hybride avec sa seq complémentaire.

### 5. Analyse du génome

#### ADN nucléaire ou ADN mitochondrial

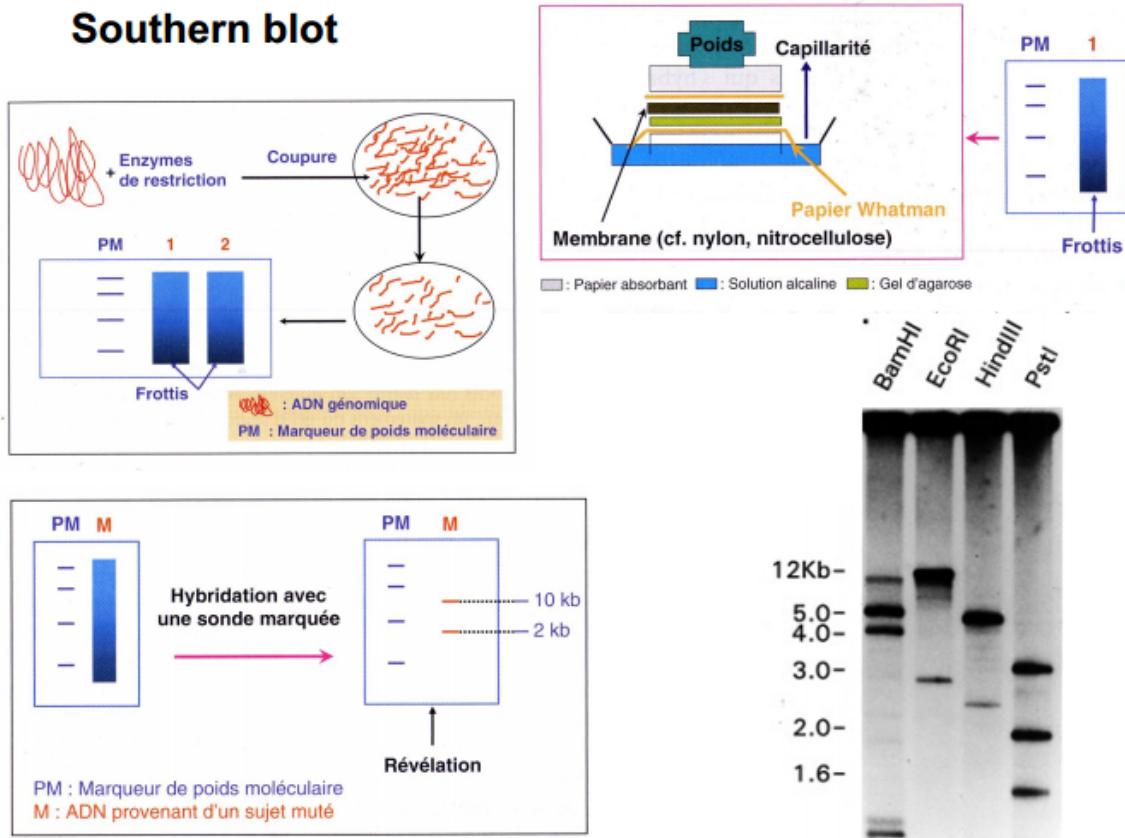
##### 5.1. Southern blot

- . 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

6) La sonde peut être fixée à des endroits parfaitement ou **partiellement** complémentaires ; Pour ne garder que les séquences de sonde parfaitement hybrides, on réalise des **lavages par des solutions salines** plus ou moins diluées pour éviter qu'il y ait des marquages non spécifiques => **On élimine les sondes hybridées de façon imparfaite par une stringence élevée (solution saline diluée)**.

- En pratique, on réalise des lavages avec des **solutions de stringence croissante progressive** (de plus en plus diluées) qui détruisent les liaisons H des sondes les moins bien hybridées. **Il faut être progressif pour ne pas éliminer aussi les sondes parfaitement hybridées.**

7) On peut révéler le duplex car la sonde a été marquée.



**Méthode de Southern :** elle était adaptée à l'analyse des ARN, sauf que l'on l'appelle « Northern Blot » pour les ARN.

- Cette méthode est utilisée pour mettre en évidence des événements génomiques comme les délétions.

Si on a une délétion **homozygote** :

- Par Southern blot, si on utilise une sonde qui aurait du s'apparier avec la région maintenant déletée, la sonde ne trouve plus de région complémentaire => abs de bandes.

Une interprétation peut être qu'il y a une délétion à l'état homozygote. Mais cela peut être lié à autre chose ! **Abs de résultat tjr problématique en biologie moléculaire => PEUT TOUJOURS être lié à une erreur technique.**

Si délétion à l'état **hétérozygote** :

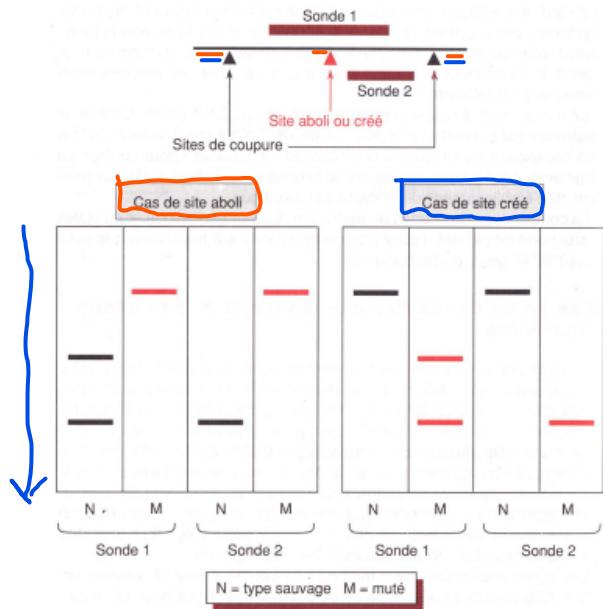
- La sonde pourrait s'hybrider avec l'allèle non déleté et donc très difficile de voir qu'une des allèles est déletée par southern blot car la tâche sera présente (peut être un peu moins intense).

## Application : détection de délétions / mutations

- **Mutation ponctuelle** : le chgt d'un nucléotide par un autre peut être mis en évidence par Southern blot avec une enzyme de restriction appropriée.

- Soit la variation **crée un nouveau site de restriction** (clivage) et on observera une nouvelle bande car la sonde sera maintenant répartie sur 3 fragments
- soit elle **abolit un site de restriction** de l'enzyme et on observera une bande en moins car la sonde sera présente sur un fragment unique.

Par cette méthode, on met en évidence une variation ponctuelle MAIS **une variation mise en évidence n'est pas forcément synonyme de mutation pathogène**.

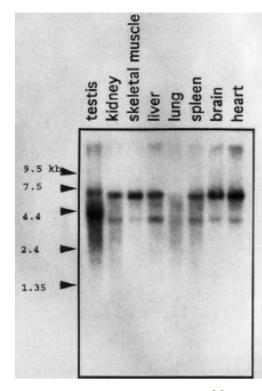


### 5.2. « Northern » blot

- Southern blot appliquée aux ARN.
- On ne clive pas l'acide nucléique ARN puisque les enzymes de restriction n'agissent que sur de l'ADN bicaténaire. De plus, les ARNm sont généralement déjà de petites tailles.
- On utilise des acides nucléiques monocaténaires (ARNm).
- Migration dans des **conditions dénaturantes**, pour ne pas que le repliement de l'ARNm intervienne et modifie la forme de l'ARNm qui perturberait alors la migration en électrophorèse.
- **Méthode semi quantitative** : appréciation quant à l'abondance de tel ou tel transcrit comparativement aux autres.

### Analyse qualitative de l'expression génique

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



32

### 5.3 Séquençage

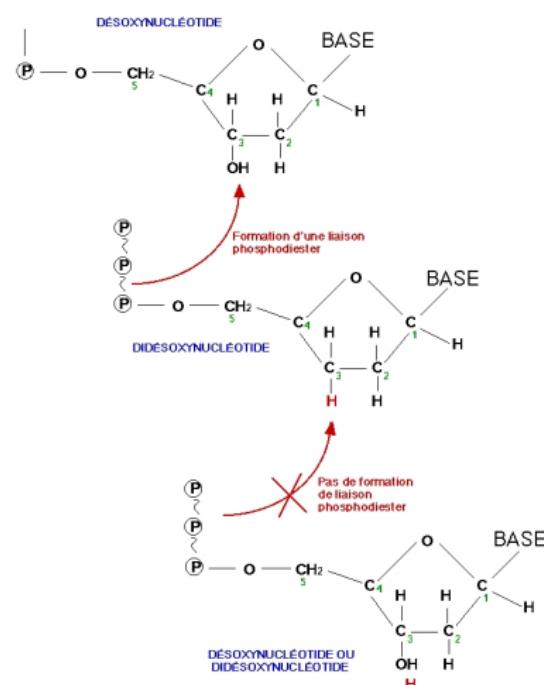
- Méthode qui permet de lire les bases sur un fragment d'ADN donné.

- **AVANT** : moyens chimiques, séquençage base après base.

### 5.3. Séquençage

#### Méthode de Sanger

(aux **didésoxy-nucléotides**)



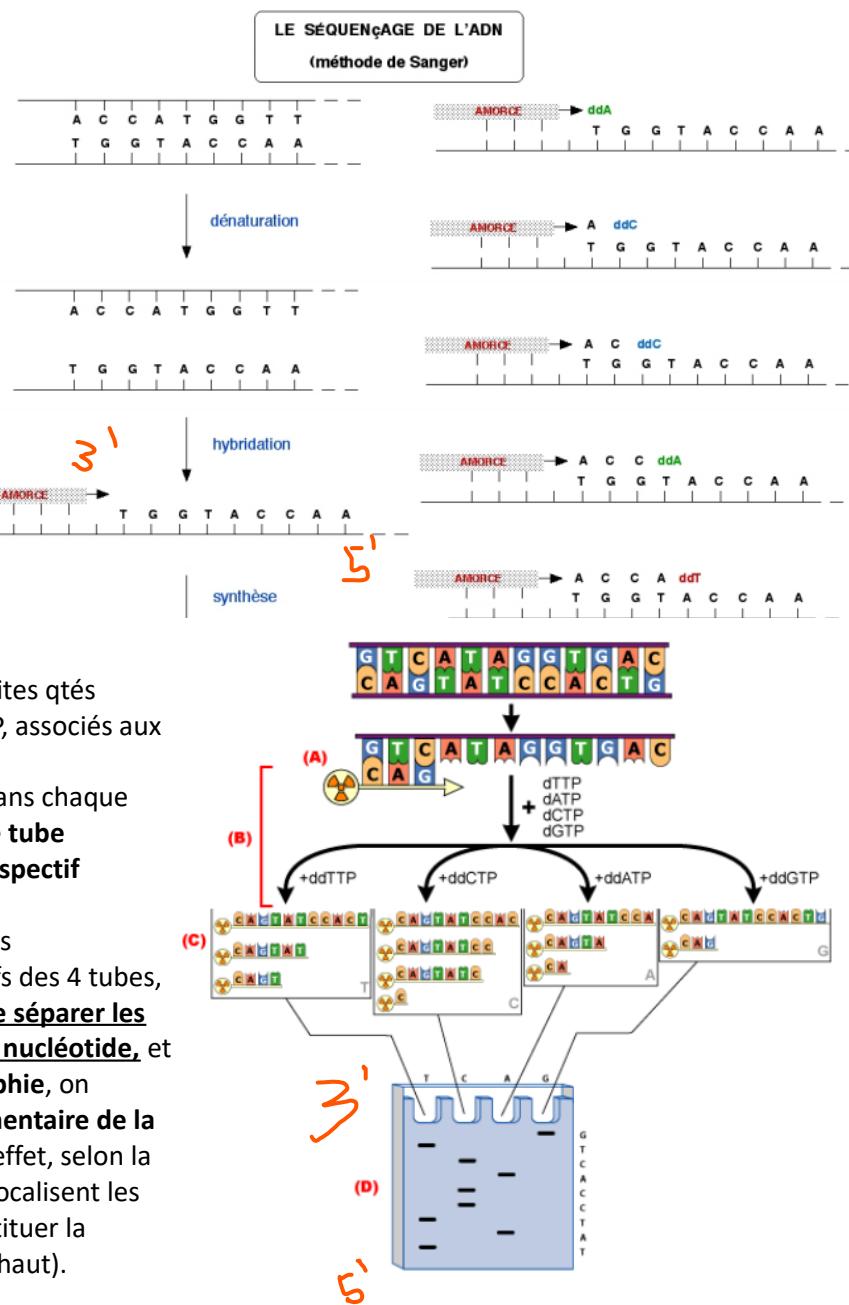
- **AUJOURD'HUI :** Grâce à la méthode de Sanger révolutionnaire à l'époque (dépassée), on peut déterminer le génome d'un organisme vivant.

Pour cela, il faut recueillir **plusieurs copies d'une même molécule d'ADN** que l'on souhaite séquencer, par exemple en l'extrayant d'un ensemble de cellules d'un même individu.

On place ces molécules d'ADN dans un tube en présence d'une **DNApolymérase**, d'une **amorce marquée** radioactivement au P32, de **dNTP** et de **ddNTP**.

- Cette méthode repose sur la **détermination base après base de la nature du nucléotide incorporé** par la DNApolymérase. En effet, au cours de la synthèse des brins complémentaires des ADN apportés, on va compter sur le fait qu'au lieu d'utiliser un dNTP, la DNA polymérase utilisera dans un très petit pourcentage de cas un **didésoxy-nucléotides (2',3'-didésoxy-nucléotide)** apporté dans le tube, qu'elle va confondre avec un nucléotide ordinaire. En faisant cela, la DNApol insère le ddNTP dans la séquence en catalysant la liaison phosphodiester 3'-5' puis **signe l'arrêt de la synthèse du brin complémentaire**. En effet, le ddNTP n'ayant pas de O en 3', la DNApol ne pourra pas catalyser la liaison phosphodiester suivante.

- La synthèse des brins complémentaires par la DNApolymérase a donc lieu dans un mélange **avec un grand excès de dNTP par rapport aux ddNTP** de sorte à ce que par rapport à toutes les molécules d'ADN présentes dans le tube, on soit sûr que la synthèse est bien allée au bout de la séquence sur au moins quelques molécules et que donc notre séquençage couvrira tous les nucléotides.



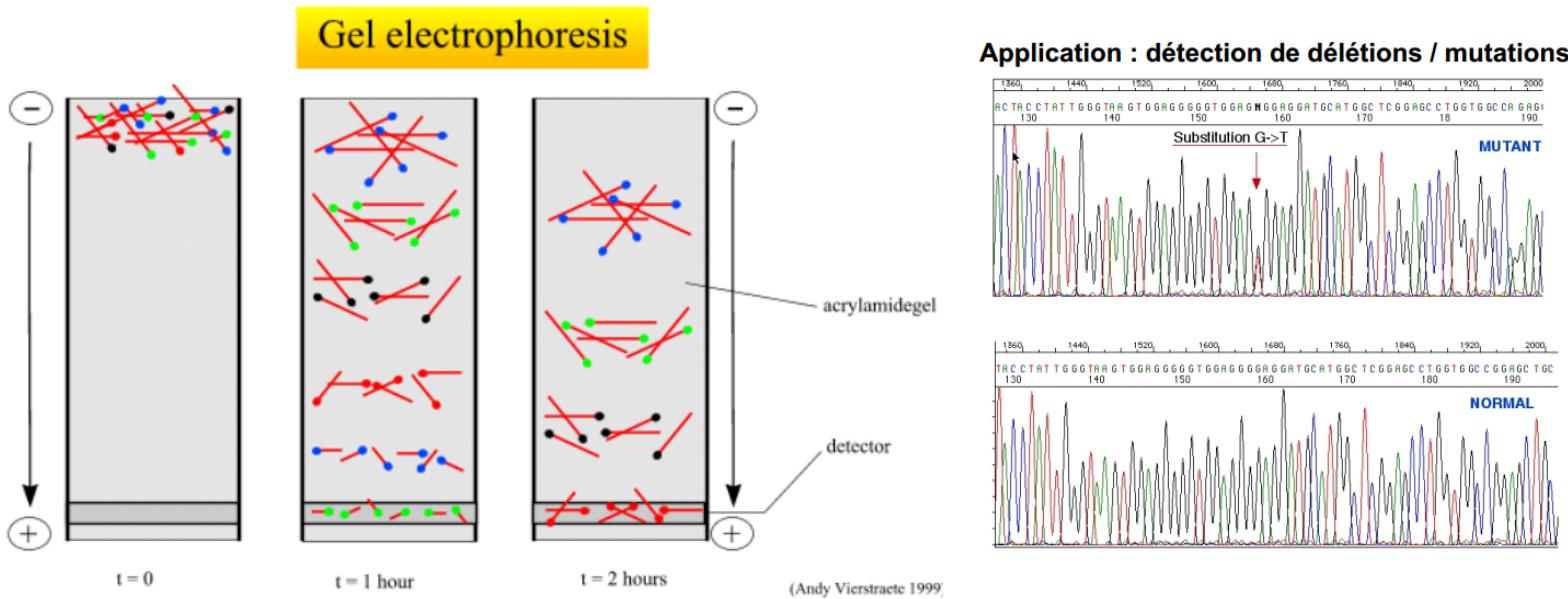
### 1ère façon :

- On marquait l'amorce au P32 en 5'.
- On préparait 4 tubes avec dans chacun des petites qtés respectivement de : ddTTP, ddCTP, ddATP, ddGTP, associés aux molécules d'ADN à séquencer.
- Après travail de la DNApol indépendamment dans chaque tube, on sait que **tous les fragments d'un même tube respectif se termineront par le même ddNTP respectif correspondant au tube**.
- Si on dépose ensuite ces brins complémentaires néosynthétisés dans 4 puits distincts et respectifs des 4 tubes, sur un **gel d'électrophorèse très résolutif afin de séparer les molécules d'ADN qui ne diffèrent que d'un seul nucléotide**, et après **migration** (selon la taille) et **autoradiographie**, on pourra établir le séquençage global **du complémentaire de la molécule d'ADN** que l'on voulait séquencer. En effet, selon la position successive (dans lequel des 4 puits) se localisent les fragments de taille croissante, on pourra reconstituer la séquence de 5' vers 3' (en lisant donc de bas en haut).

*2ème façon :*

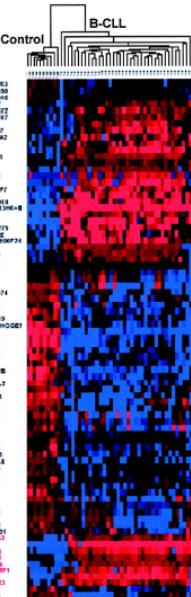
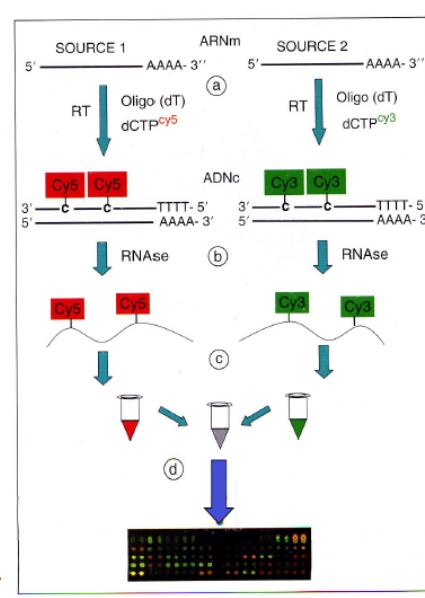
- Aujourd’hui, on n’utilise plus des amorces marquées mais des ddNTP marqués chacun avec un fluorophore distinct. On peut donc réaliser la réaction de séquençage dans le même tube (un seul puits).
  - Au cours de la migration, les brins de même taille migrant plus rapidement => cad les **brins les plus courts** => donc ceux qui portent des ddNTP marqués en premières positions => vont défiler sous le détecteur du fluorophore plus tôt que les **brins plus longs** permettant ainsi de reconstituer temporellement la séquence nucléotidique au fur et à mesure que les fragments (qui ont à chaque fois un nucléotide de plus de différence) franchissent le détecteur et que leur fluorophore détecté soit associé au bon nucléotide.
  - Pour cela, on n’utilise plus des grands gels d’électrophorèse mais on fait une électrophorèse capillaire. Le matériau est placé dans un tube capillaire.

**Lors de l'interprétation des signaux fluorescents** : Quand deux pics se superposent (ont migré en même temps), cela peut être dû à un individu hétérozygote (deux allèles avec variation ponctuelle d'un nucléotide entre les deux : ce sont bien des molécules d'ADN « identiques » même si elles ont des allèles différentes, et elles migrent en même temps car elles font la même taille => le ddNTP marqué est présent sur la même position).



#### 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**