LES OUTILS DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
(partie 1)

Pr. HABAK NAWAL
Faculté de médecine
EHS PIERRE ET MARIE CURIE

2020-2021

PLAN

INTRODUCTION

LES OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1-LES ENZYMES

a- Les enzymes qui coupent l'ADN:

Les Enzymes de restriction

La Dnase

La nucléaseS1

Les Exonucléases

b- Les enzymes de ligature

c- Les enzymes de déphosphorylation

d- Les enzymes de phosphorylation

e-Les enzymes qui recopient un acide nucléique

2- LES SONDES NUCLEOTIDIQUES

3- LES VECTEURS

4- LES MODELES D'ETUDE

Pr. HABAK NAWAL
Faculté de médecine
EHS PIERRE ET MARIE CURIE

Introduction

- Il existe toute une série d'outils indispensables pour analyser l'ADN, le cloner, l'amplifier, le transporter grâce à des vecteurs, ou l'intégrer dans des cellules hôtes…

- Ces outils ont permis de mettre en place des techniques qui sont à l'origine du développement de la biologie moléculaire.

Les outils en biologie moléculaire

Les enzymes

- Les enzymes qui coupent l'ADN:
  - **Enzymes de restriction**
  - **La Dnase**
  - **La nucléaseS1**
  - **Les Exonucléases**
- Les enzymes de ligature
- Les enzymes de déphosphorylation
- Les enzymes de phosphorylation
- Les enzymes qui recopient un acide nucléique

Les sondes nucléotidiques

ADN
ARN

Les vecteurs:

- **Les bactériophages,**
- **Plasmides**
- **cosmides.**

Modèles d'étude

Bactéries ; parasites; animaux

1-Les enzymes

a- LES ENZYMES QUI COUPENT L'ADN

- **Enzymes de restriction**
- **La Dnase**
- **La nucléaseS1**
- **Les Exonucléases**

LES ENZYMES DE RESTRICTION

Caractéristiques :

- ✓ C'est des endo-nucléases
- ✓ coupent l'ADN au niveau de sites appelés sites de restriction ;
- ✓ Possèdent chacune son propre site de restriction
- ✓ ont la particularité de couper l'ADN sur ses deux brins.
- ✓ sont réparties en trois classes en fonction des types de sites qu'elles reconnaissent :

• **Type** I : elles reconnaissent des séquences particulières mais qui ne présentent aucune symétrie, et ne coupent pas l'ADN au niveau de ce site mais plus loin sur l'ADN (environ 1 000 nucléotides).

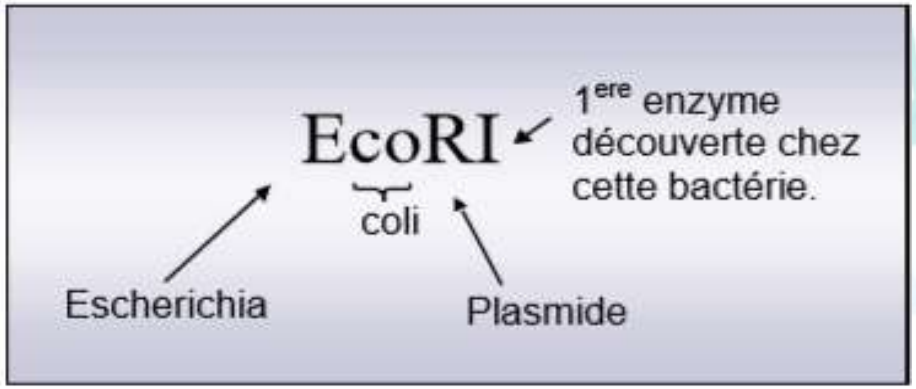
• **Type II** : ce sont ces enzymes les plus nombreuses ; ces sites sont le plus souvent des séquences palindromiques de 4 à 8 nucléotides(séquences ADN à symétrie inversée)

- 5' … GAATTC … 3'
- 3' … CTTAAG … 5

• **Type III** : mêmes particularités que les enzymes de type I, mais elles coupent l'ADN à environ 20 nucléotides du site de reconnaissance.

Nomenclature Des Enzymes De Restriction

- 1ere lettre en majuscule : origine bactérienne de l'enzyme.
- 2 lettres suivantes : genre de la bactérie.
- 1 lettre supplémentaire : souche bactérienne si nécessaire.
- Chiffre romain : numéro selon l'ordre de la découverte de l'enzyme dans la même souche bactérienne.



Exemples

Eco RI Extraite d'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

Mode de coupure de l'ADN par les enzymes de restriction

Deux types de coupures :

- La coupure se fait au milieu du site

  Ce qui entraîne la création d'extrémités franches

	T	G	G	A	C	C	
	A	C	C	T	G	G	

- La coupure se fait de part et d'autre du centre de symétrie

  Ce qui entraîne la création d'extrémités cohésives

  (bouts collants)

	G	G	A	T	C	C	
	C	C	T	A	G	G	

La DNase

- généralement d’origine bovine (pancréas).
- C’est une endonucléase
- possède la propriété de couper une molécule d’ADN double brin au hasard, engendrant ainsi des fragments d’ADN double brin.

La nucléase S1

- isolée d’un champignon, Aspergillus oryzae
- Ne coupe que l’ADN simple brin.

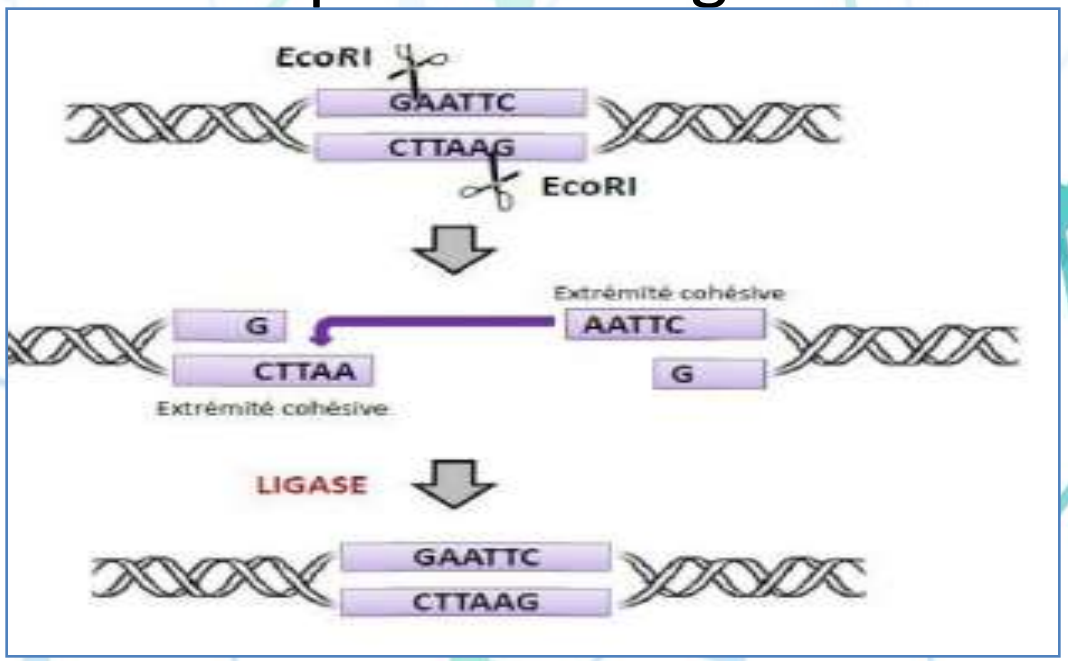
Les exonucléases

- Coupent les extrémités libres des molécules d’ADN en libérant des nucléotides.

b-Les enzymes de ligature

Les ligases:

- Généralement c'est la ligase du virus T4 (extraite de bactéries infectées par le virusT4).
- Il est plus facile de liguer deux fragments à extrémités cohésives que deux fragments à coupure franche.



c-Les enzymes de déphosphorylation

Les phosphatases

- ✓ catalysent l'élimination d'un groupement phosphate en 5'd'une chaine d'ADN.
- ✓ Il est courant de déphosphoryler un vecteur que l'on vient d'ouvrir par un enzyme de restriction, afin d'éviter une refermeture de ce vecteur.

d-Les enzymes de phosphorylation

- Les kinases :
  - permettent le transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP.
  - Il s'agit du phosphate en position gamma Il sera transféré à l'extrémité 5'd'un ADN déphosphorylé

e-Les enzymes qui recopient un acide nucléique

ADN-ADN

- Les ADN polymérases synthétisent une chaine d'ADN à partir d'un modèle.
- une ADN polymérase n'est pas capable de commencer une chaine d'acides nucléiques.
- Il est nécessaire d'apporter dans le milieu réactionnel, une amorce d'acide nucléique.

1. ADN polymérase I et enzyme de Klenow

- l'ADN polymérase d'E coli est la plus utilisée.
- Elle est constituée d'une seule chaine peptidique et possède trois activités enzymatiques:
  - - une activité de synthèse ADN polymérase 5'-3';
  - - une activité de dégradation exonucléase 3'-5'
  - - une activité de dégradation exonucléase 5'-3'.
- L'enzyme de Klenow
  - obtenu à partir de l'ADN polymérase I
  - Possède les activités polymérase 5'-3' et exonucléase 3'-5'

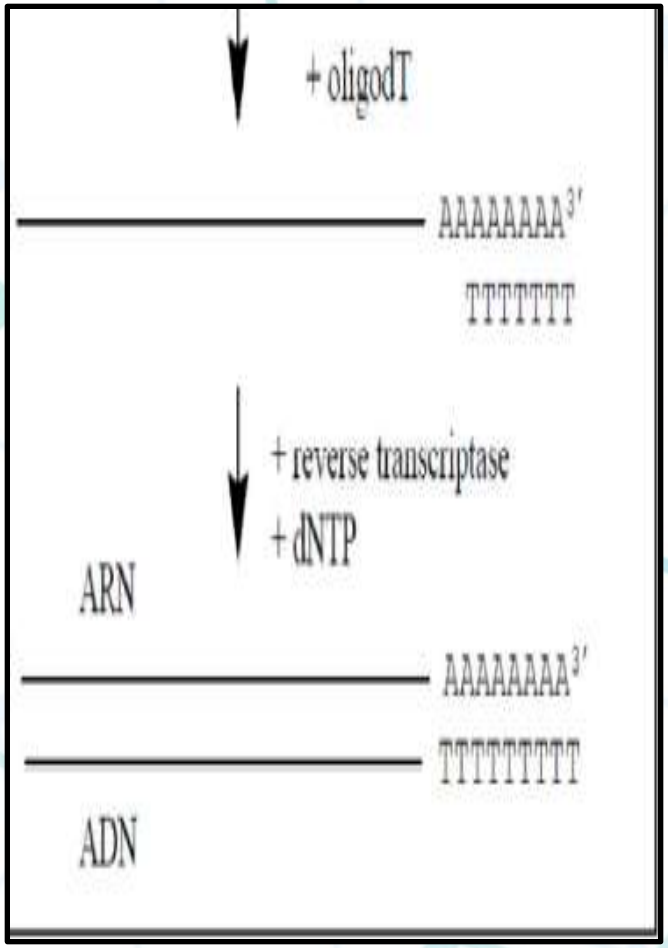
2.Les ADN polymérases thermorésistantes

- La Taq polymérase (première identifiée *de la bactérie : Thermus aquaticus*).
- isolée des bactéries vivant dans les sources d'eau chaude.
- Elle agit à une température voisine de 65°c.
- Elle est utilisée :
  - la polymérase chaine réaction PCR
  - les techniques de séquençages de l'ADN

ARN-ADN

- Enzyme isolée de rétrovirus :

  La rétrotranscriptase «RT»;
- Elle permet de fabriquer un ADNc à partir d'un ARNm.
- La RT est une ADN polymérase 5'-3'ayant les caractérisiques suivantes:
  - ARN dépendante;
  - dépourvue d'activité exonucléase 3'-5'
  - Possède une activité RNase.
  - permet de synthétiser le premier brin de l'ADNc (ADN double brin) à partir d'un ARNm.
  - Une amorce oligo (dT) qui s'hybrideront au poly (A) de l'ARNm et permettra d'initier l'action de la RT.



ADN-ARN

- L’ARN polymérase
  - Elle est utilisée pour effectuer des transcriptions in vitro.
  - Elle est capable de commencer une chaine.

2- Les sondes nucléotidiques

Définition

Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides

Elle permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier

La synthèse d'une sonde

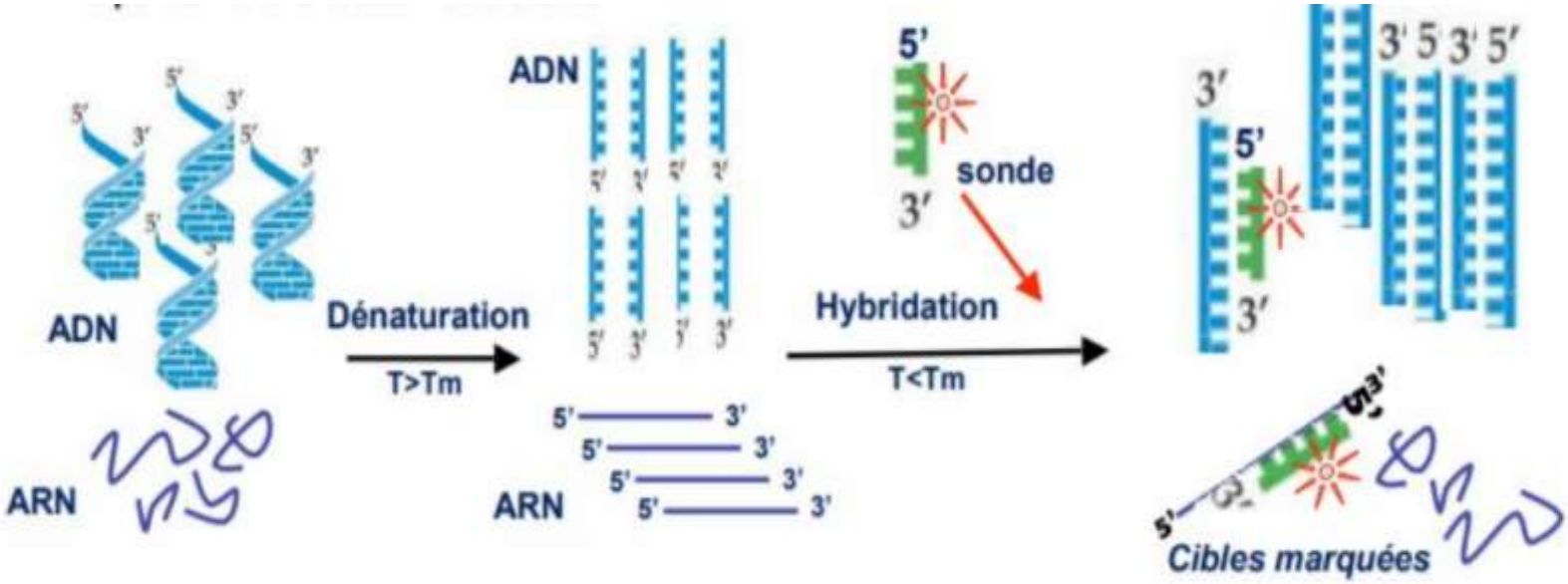
- ✓ Elle peut être fabriquée par synthèse chimique, si la séquence de l'ADN est connue.

- ✓ Si elle est inconnue, il faut étudier la protéine correspondante et remonter grâce au code génétique à la séquence d'ADN.

Caractéristiques générales d'une sonde :

- ✓ La sonde peut être soit une séquence **d'ADN ou d'ARN,**
- ✓ Elle est **obligatoirement** monobrin.
- ✓ Sa taille est très variable:
  - oligo-nucleotides de 20-30 nucléotides
  - plusieurs centaines de nucléotides.
- ✓ La sonde est complémentaire et antiparallèle du fragment recherché.
- ✓ la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage.
- ✓ Le marquage se fait de 2 façons:
  - **Chaud**: utilisation d'isotopes radioactifs (32P, 35S, 3H) en α ou en γ
  - **Froid** : utilisation d'enzymes (PAL, Peroxydase)

Caractéristiques générales d'une sonde



3. Application

- Recherche des cytosines méthylées;
- Étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction;
- Mise en évidence des mutations.

3- Les vecteurs

- Ce sont des petites molécules d'ADN dans lesquels on insère le fragment d'ADN à étudier.

- Ces petits ADN sont généralement des virus bactériens (bactériophages) ou des plasmides.

- Ils possèdent dans leur génome les signaux nécessaires pour leur réplication, mais ils ne savent pas se multiplier seuls.

- Ils doivent être introduits dans des cellules hôtes (bactéries).

Les catégories de vecteurs

- Il existe deux grandes catégories de vecteurs :

  1 - Vecteur de clonage : renferme une origine de réplication (Ori V

- il permet de cloner un segment d'ADN ou un gène qui y est intégré.

  2 - Vecteur d'expression : Renferme un promoteur, il permet de faire exprimer un gène

LES VECTEURS DE CLONAGE

- l'ADN recombinant est obtenu , en insérant un fragment d'ADN étranger dans un vecteur de clonage;

- Un vecteur de clonage est constitué d'une molécule d'ADN capable de se répliquer de façon autonome;

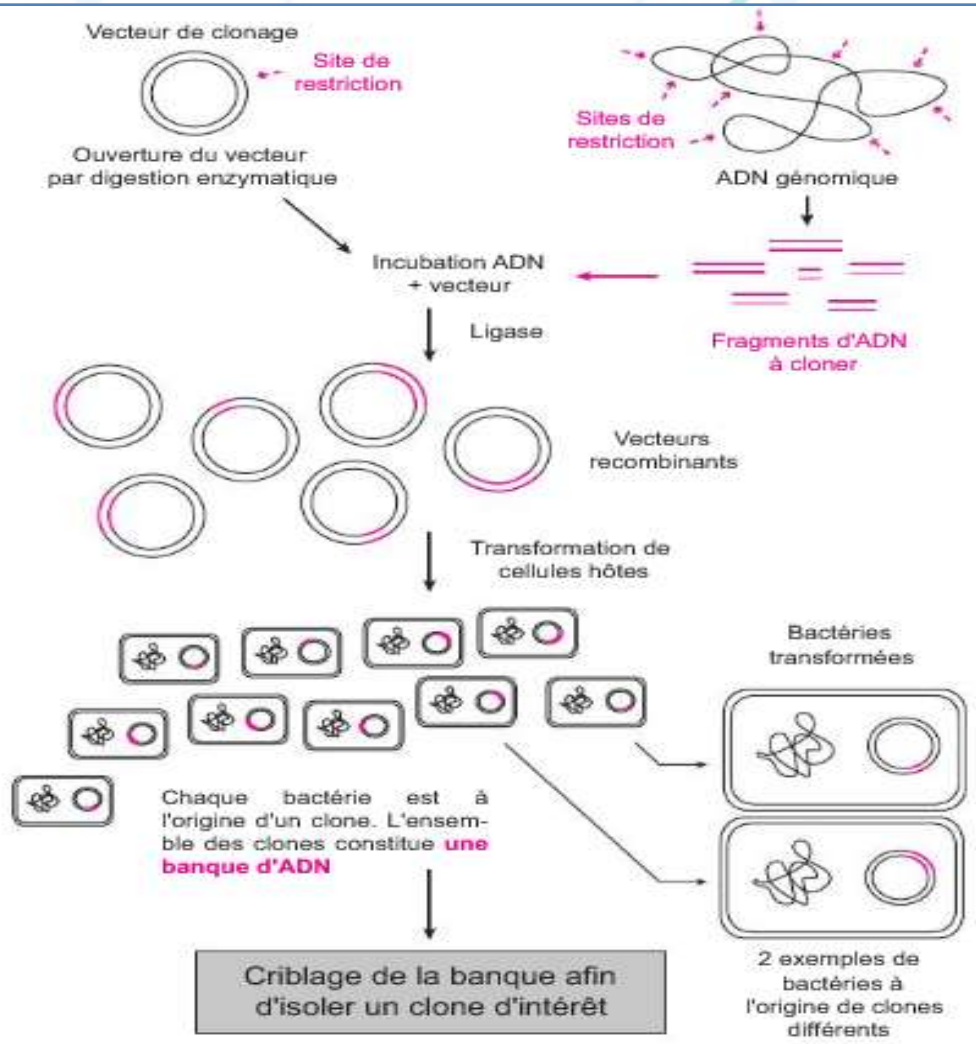
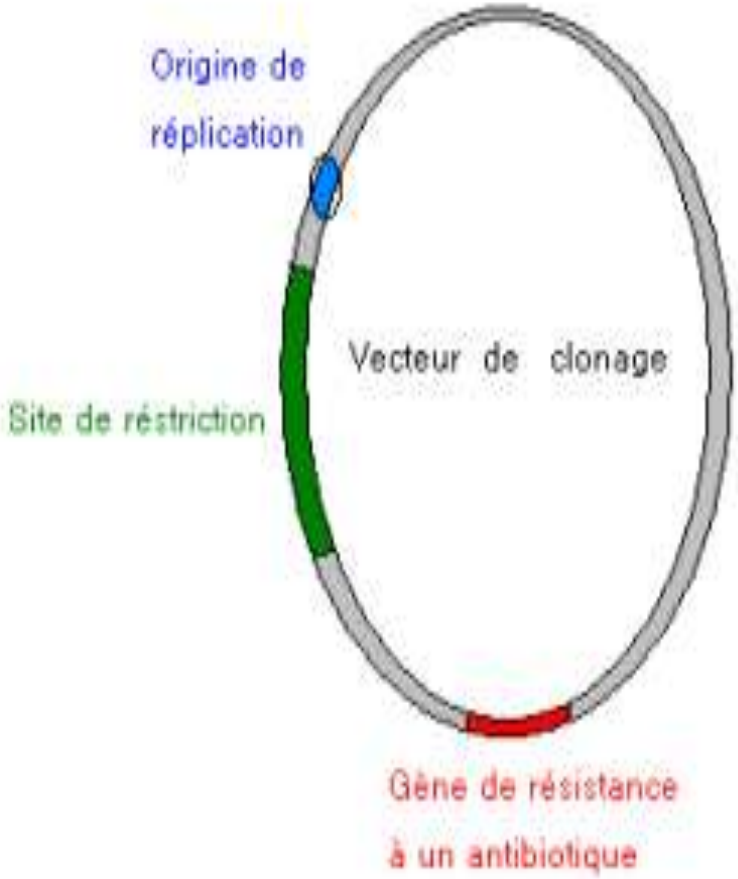


Figure 6-4 Les principales étapes de clonage. Les fragments d'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction sont insérés dans des vecteurs plasmidiques. Chaque bactérie transformée par un plasmide qui contient un fragment d'ADN est sélectionnée par culture sur un milieu contenant un antibiotique, elle est à l'origine d'un clone bactérien.

Les Vecteur d'expression



A retenir

- En biologie moléculaire et en génie génétique, les vecteurs sont
  - des organismes qui ne provoquent pas eux-mêmes une maladie mais qui dispersent l'infection en transportant les agents pathogènes d'un hôte à l'autre
  - des molécules d'ADN permettant la propagation de séquences d'intérêt.
  - Il s'agit de molécules d'ADN chimères telles que les plasmides ou les chromosomes artificiels bactériens, contenant une origine de réplication et un ou plusieurs marqueurs génétiques.
  - L'origine de réplication permet le maintien du vecteur dans la cellule cible au cours des générations.

1. Les bactériophages

- Deux phages très utilisés comme vecteurs:
  - les phages λ (lambda); un phage à ADN double brin, linéaire;
  - le phage M13 (un bactériophage spécifique d'E.coli) constitué d'un simple brin d'ADN circulaire.

2. Les plasmides

- Ce sont de petits fragments d'ADN circulaire double brin,
- Ils se répliquent grâce à des enzymes dans la bactérie.
- Au laboratoire, on retrouve des plasmides artificiels créés à partir de plasmides naturels auxquels certaines séquences ont été ajoutées.

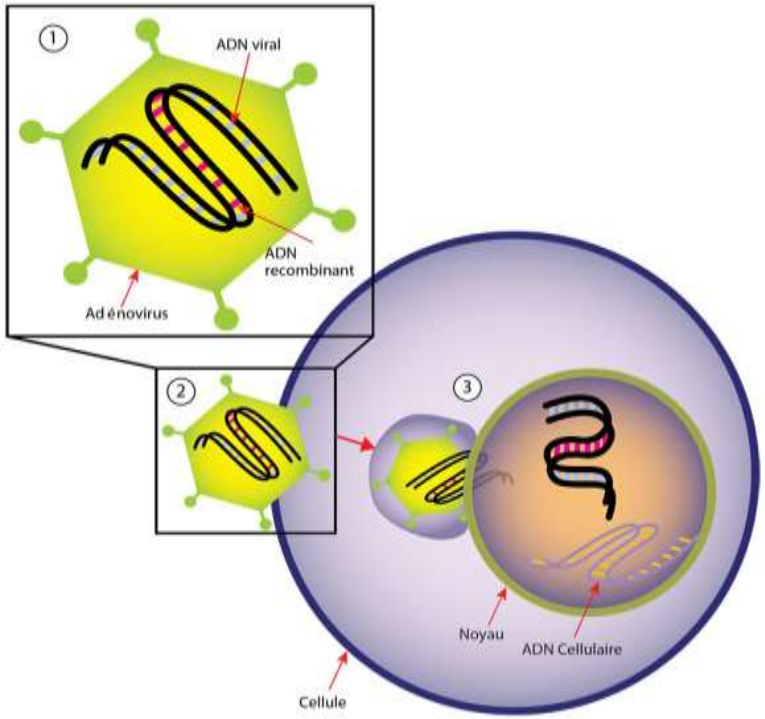
3. Les cosmides

- Les cosmides sont des vecteurs artificiels hybrides:
  - plasmide-phage λ.
  - Il est possible de cloner de plus grands fragments
  - Ils servent à fabriquer des banques génomiques
  - Ils renferment également un gène de résistance à l'ampicilline.

Les différents types de vecteurs

Tableau 6.2 Vecteurs de clonage chez *E. coli* ; kb : Kilobases.

Type de vecteur	Taille maximum du fragment d'ADN cloné
Plasmide, vecteur rétroviral	10 kb
Phage lambda (λ)	15 kb
Cosmide	45 kb
BAC (« Bacterial Artificial Chromosome »)	300 kb



4- Organismes modèles d'étude

Les modèles d'étude qui souvent représentatifs de leur règne, sont :

- *Escherichia Coli : bactérie*
- *Saccharomyces Cerevisiae : levure*
- *Arabidopsis Thaliana : plante*
- *Drosophila Melanogaster : insecte*
- *Mus Musculus : mammifère*

Les cellules-hôtes

Elles sont destinées à **recevoir** le vecteur

Elles doivent répondre à certaines conditions:

- **Choix de la souche (**non pathogène pour l'homme)
- **Croissance en milieu liquide**
- **Distinction entre infection, transformation et transfection**

Infection

- La bactérie est mise en contact avec le virus.
  - L'infection par le phage λ en phase lytique se traduit par l'apparition de plages de lyse.
  - L'infection par le phage M13 aboutira à des colonies bactériennes contenant ces virus.

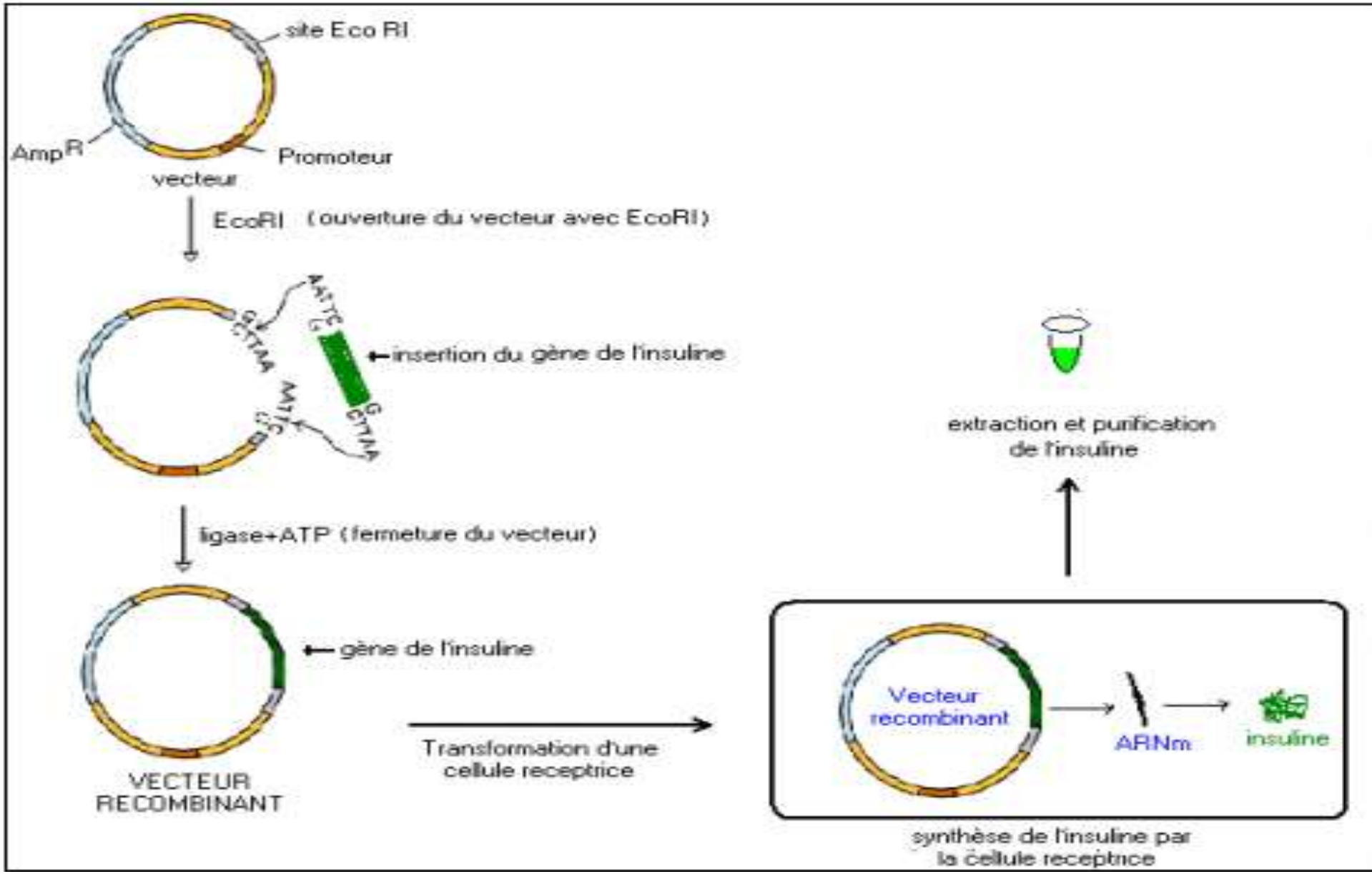
Transformation

- l'ADN double brin (plasmide) est mis en contact avec les bactéries prétraitées pour être répliquer.

Transfection

- Elle consiste à faire entrer dans les cellules un ADN double brin, soit en fragilisant la membrane plasmique , soit en incluant l'ADN dans des gouttelettes lipidiques (liposomes) qui seront internalisées par les cellules (lipofection).

Exemple : stratégie de la synthèse de l'insuline par génie génétique

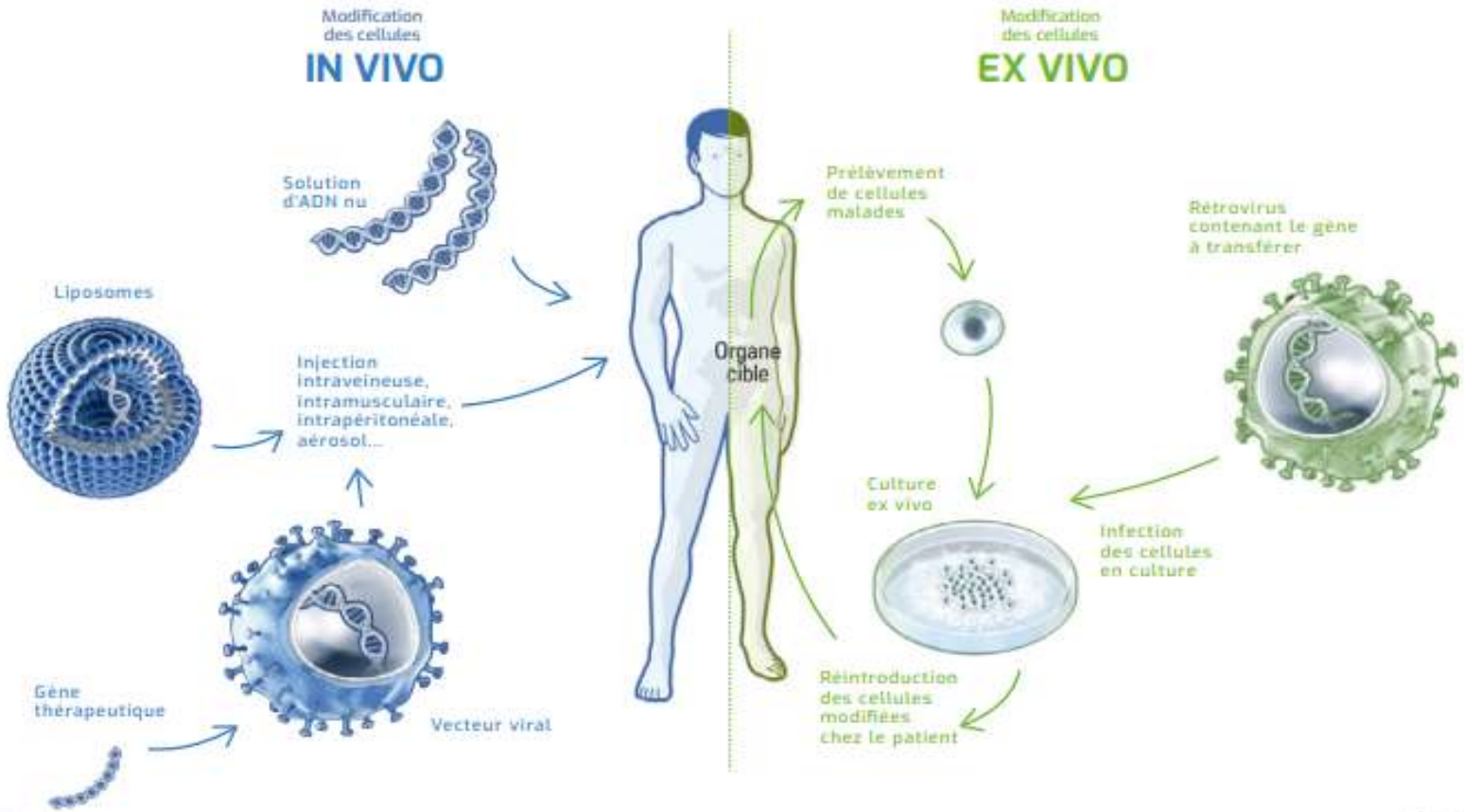


Exemple: Vecteurs et thérapie génique

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique qui consiste à faire pénétrer des gènes dans les cellules ou les tissus d'un individu pour traiter une maladie.

Deux approches existent : soit injecter directement le matériel génétique fonctionnel (solution d'ADN nu, liposomes ou vecteur viral) soit le multiplier d'abord en laboratoire dans des cellules mutées de l'organisme.

- **Les deux voies de la thérapie génique**



Activer Windo

LES OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE (partie 2)

Pr. HABAK NAWAL
Faculté de médecine
EHS PIERRE ET MARIE CURIE

PLAN

INTRODUCTION

Rappel

- structure
- propriétés physico-chimiques.

Préparation des acides nucléiques

Principe de l'extraction
Extraction de l'ADN
Qualité et quantification de l'échantillon d'ADN
Extraction de l'ARN
Qualité et quantification de l'échantillon d'ARN

Séparation de fragments d'ADN

Principe de l'électrophorèse
Révélation
analyse des résultats
Applications de l'électrophorèse
Facteurs affectant la migration

Les techniques de base d'analyse de l'ADN

PCR (Polymerase Chain Reaction)

1-Principe
2-Acteurs de la PCR
3-Etapes
4-Optimisation de la PCR
5- Intérêt de la PCR
6-Les variantes de la PCR
7- Purification des P PCR

Les techniques d'hybridation des acides nucléiques

1-Principe
2-Les types d'hybridation
Hybridation sur support liquide
Hybridation sur support solide
Hybridation in situ

Le séquençage des acides nucléiques

1- Principe
2-les étapes
3- Automatisation du séquençage
4-Les nouvelles techniques de séquençage
5-Applications

Introduction

- **Les techniques de biologie moléculaire font appel à :**

- la structure des acides nucléiques.

- Physico-chimiques (chromatographie et électrophorèse).

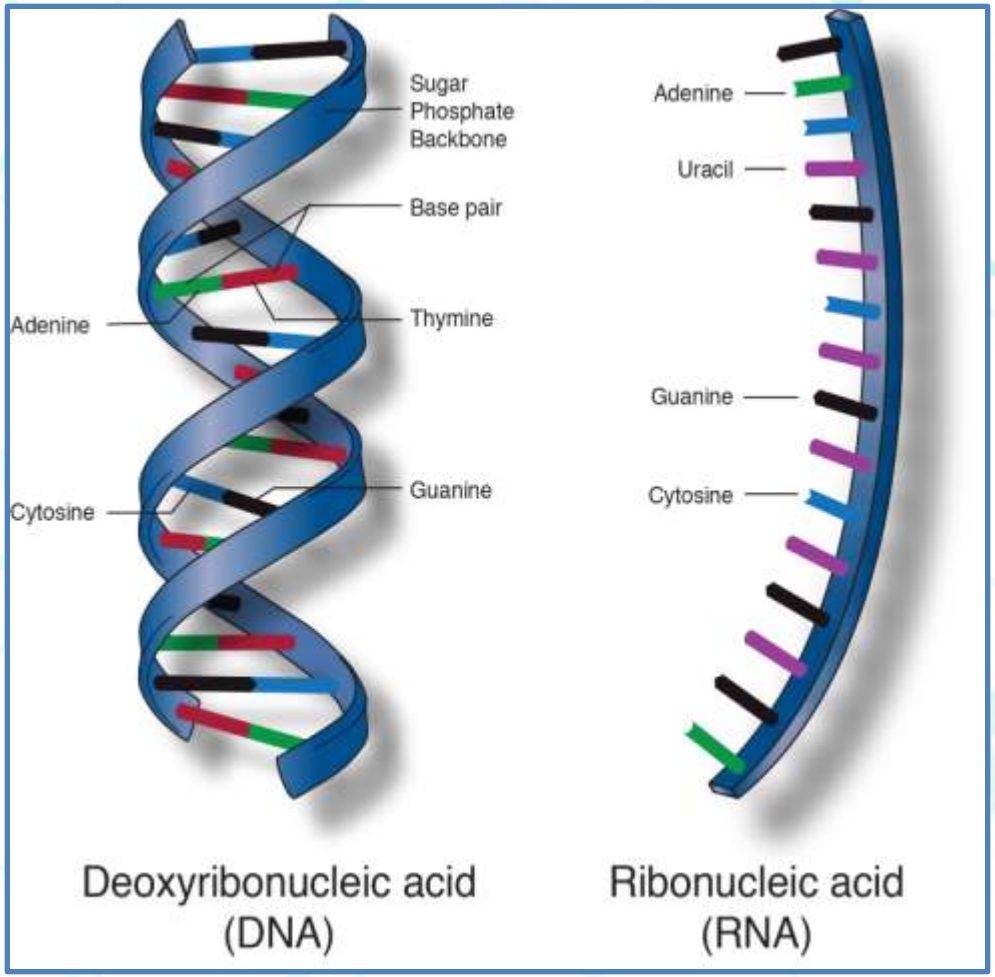
RAPPEL

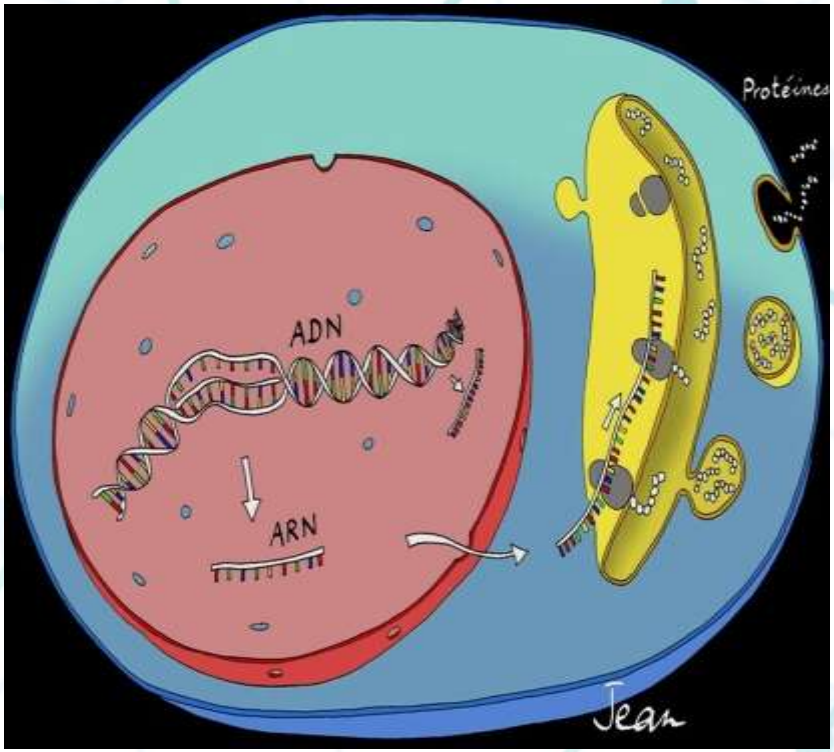
STRUCTURE

PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES

STRUCTURE DES AN

Il existe deux types *d'acide nucléique* : ADN et ARN.





Les propriétés de l'ADN

- Poids moléculaire
- La solubilité
- Absorption
- Dénaturation thermique
- Hydrolyse

Alcaline
Acide
enzymatique

Le poids moléculaires

- Le poids moléculaire de l’ADN est très élevé.

- Ce paramètre est mis à profit lors de méthodes comme la chromatographie et l’électrophorèse.

solubilité

- A pH physiologique, l'ADN est chargé négativement.
- l'ADN a un caractère acide (la présence de groupements phosphates (OH ionisés));
- l'ADN est solubles dans l'eau.
- l'ADN se dissout facilement dans les solutions salines diluées et entrainant une augmentation importante de la viscosité de la solution.
- l'ADN précipite à forte concentration en sels et en présence d'alcools l'éthanol

Densité

- Déterminer par centrifugation dans un gradient de chlorure de césium (CsCl).

- Au cours de la centrifugation il se forme un gradient de chlorure de césium, l'ADN se concentre en une bande à l'endroit où la densité de la solution de CsCl est égale à la sienne.

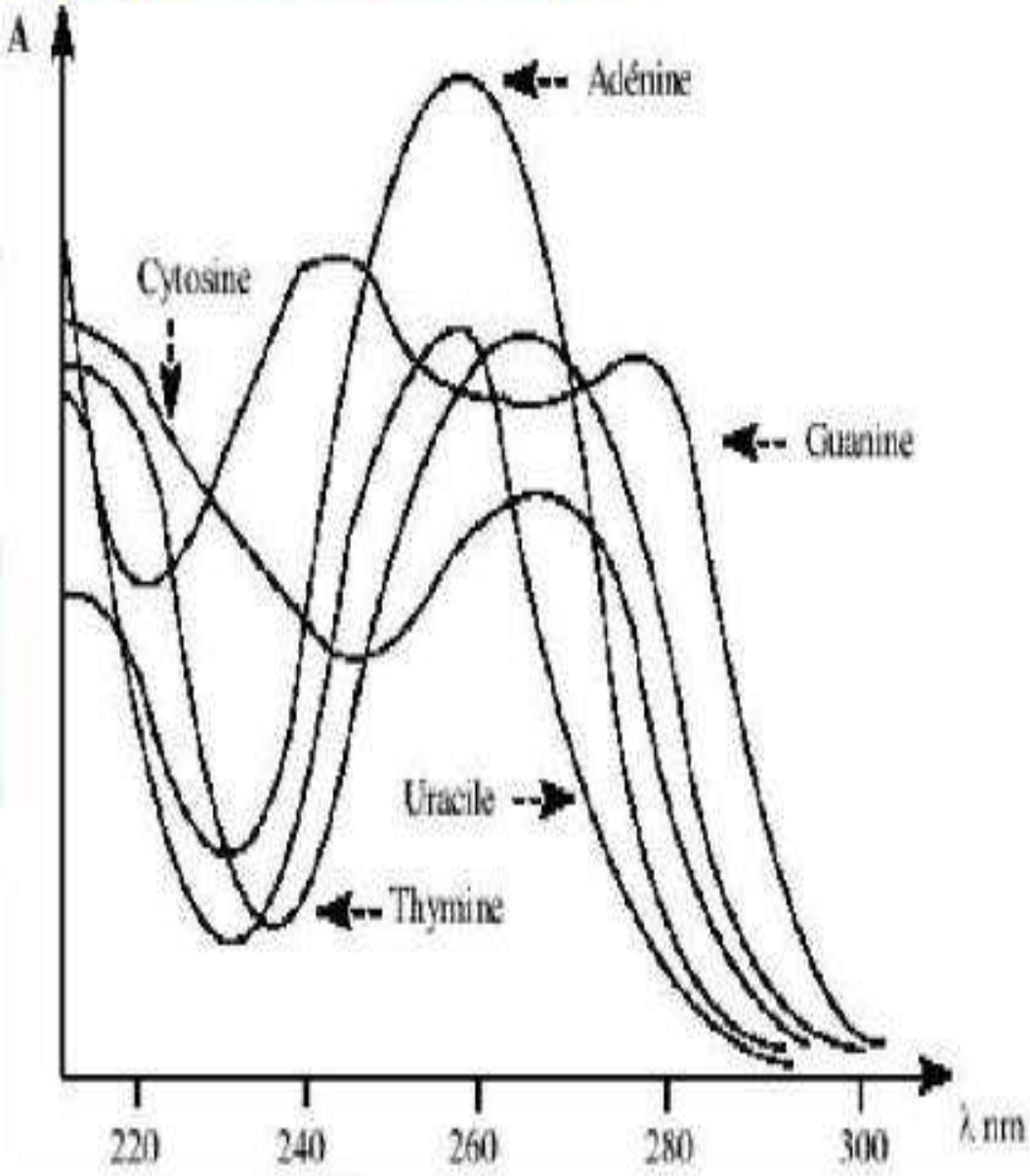
Propriétés spectrales

- toutes les Bases azotées absorbent dans l'UV à 260 nm

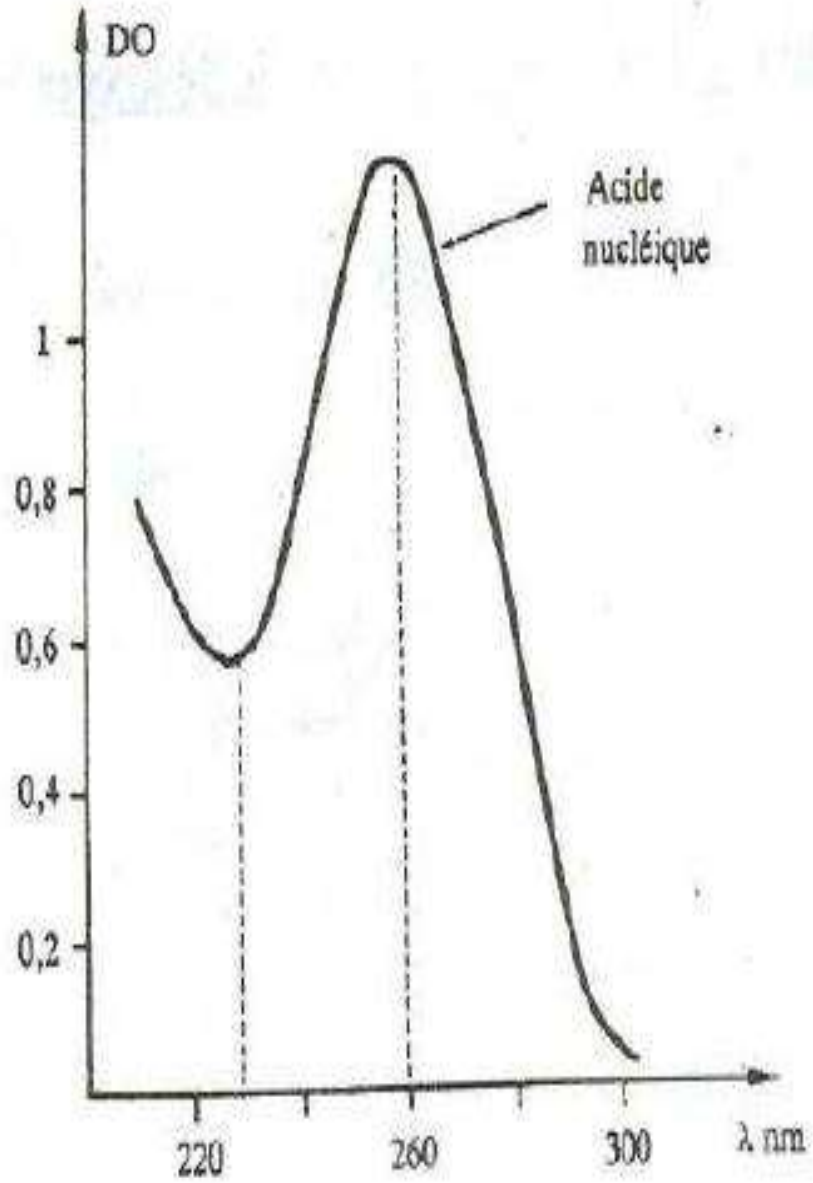
- Absorption de la molécule d'ADN est **nettement inférieure à celle d' un mélange des mêmes bases libres aux mêmes concentrations**

- Ce phénomène est appelé effet **hypochrome.**

Spectre d'absorption dans l'ultra-violet (UV) des bases azotées à pH 7

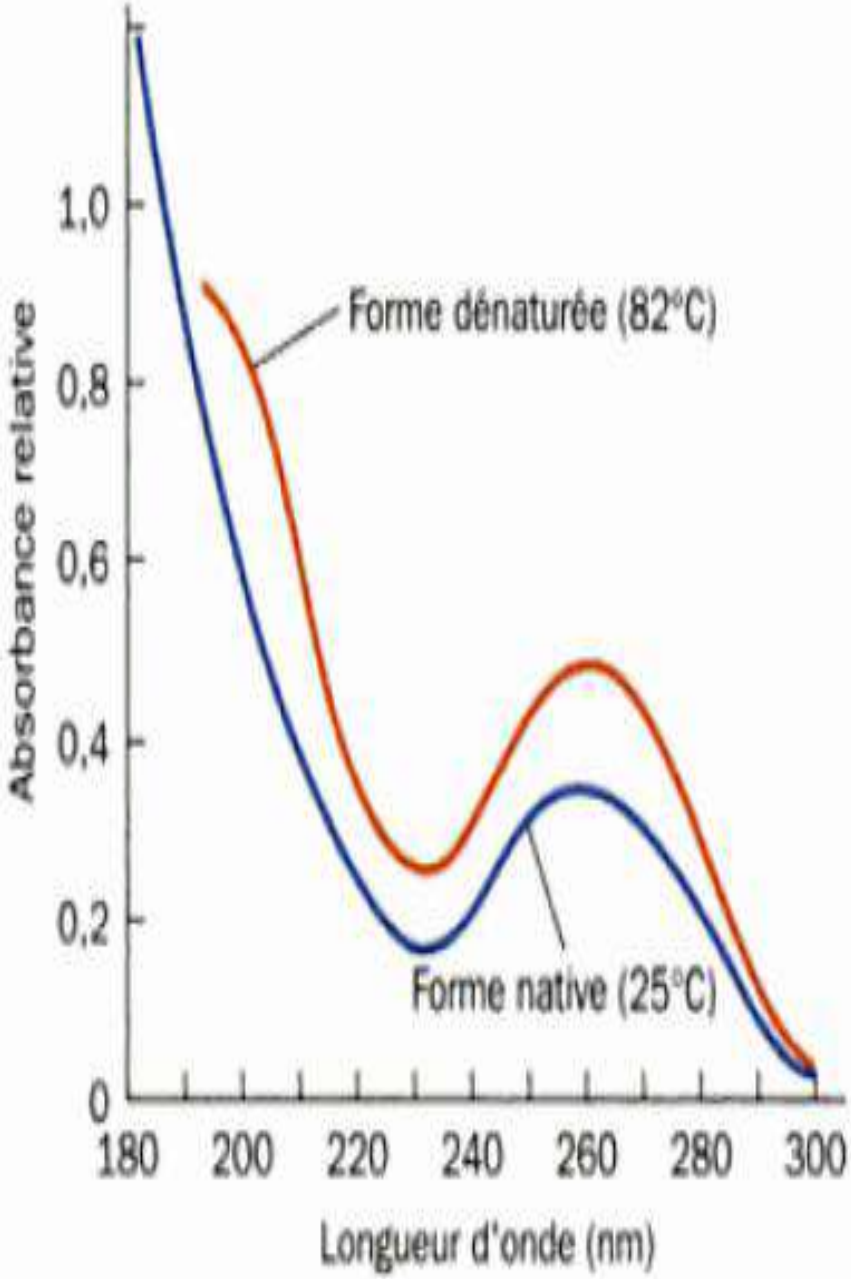


Spectre d'absorption d'un acide nucléique



Autre phénomène
hyperchromie

- maximum d'absorption à la longueur d'onde de 260 nm.
- **l'ADN monocaténaire absorbe plus que l'ADN bicaténaire.**
- Dans l'ADN double brin, les bases sont masquées ou se chevauchent, alors que dans l'ADN simple brin il n'y a pas de structure qui cache les bases, donc l'absorbance est plus importante.



Dénaturation et renaturation

- Dénaturation d'une molécule = perte de sa structure tridimensionnelle sans altération de la structure primaire.

- Pour d'ADN double brins
  = rupture des liaisons hydrogènes entre les bases obtention de l'ADN monocaténaire.

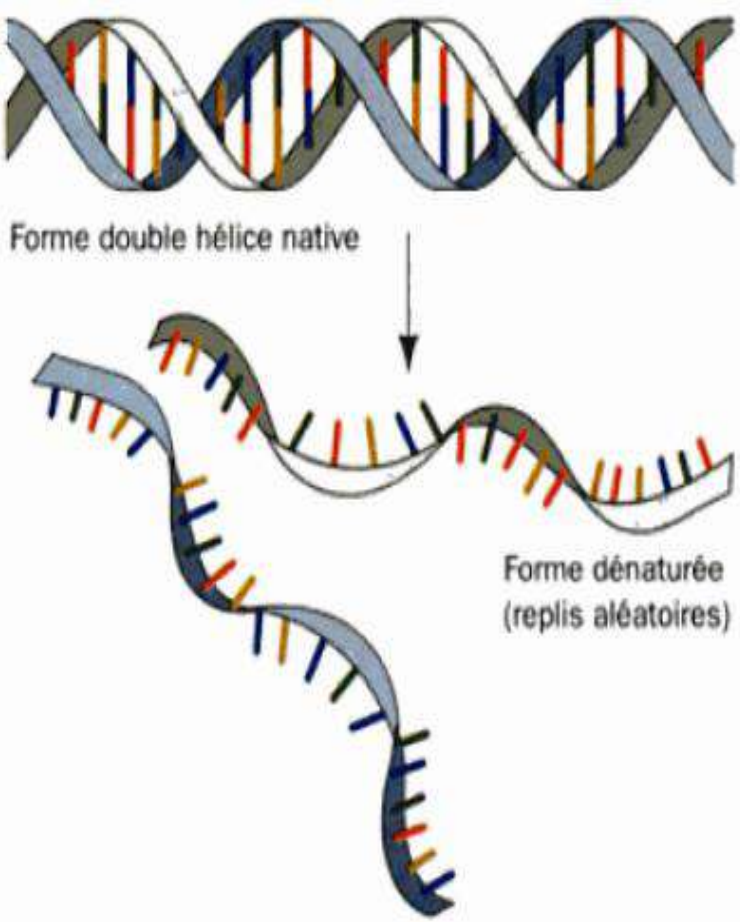


FIGURE 5-14 Représentation schématique de la séparation des brins de l'ADN duplex lors de sa dénaturation par la chaleur.

Moyens de dénaturation

Moyens physiques

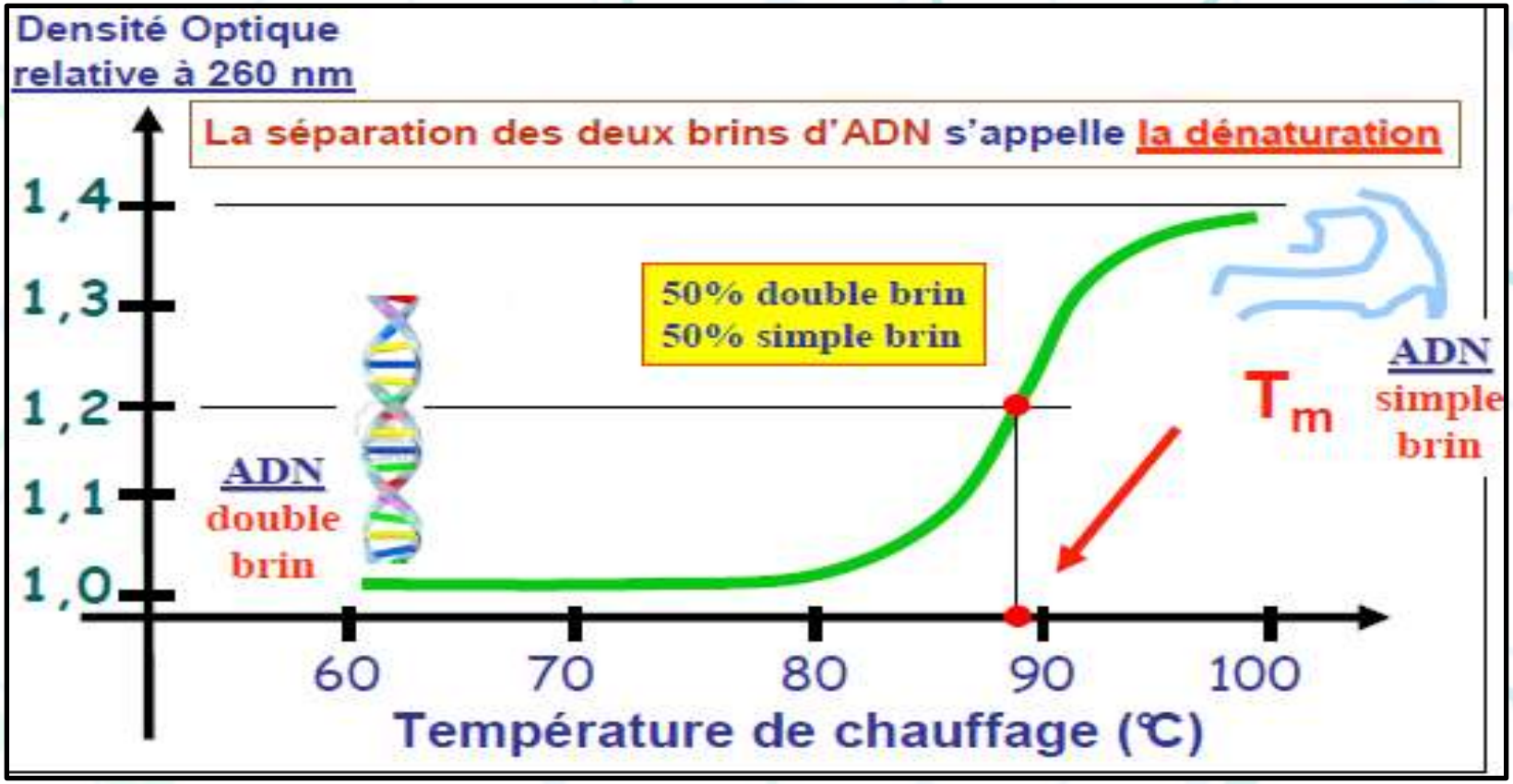
- température,
- pH extrême,
- diminution de la concentration en sel.

Moyens chimiques :

- urée,
- de soude,
- formaldéhyde.

Tm: Température de fusion de l'ADN

Tm = Température de fusion de l'ADN.
= Température moyenne pour laquelle la moitié de cet ADN est dénaturé.



facteurs influençant la valeur de la Tm

- **la composition en bases** : composition en G+C

- **les mésappariements**

l'abaissement de la Tm est de 1°C pour une valeur de 1% de mésappariement.

- **la nature du milieu de l'ADN:**

Tm diminue:

- A faibles concentrations en sel ,
- en présence de formamide, pour 100 pb :

$\Delta Tm = -0,6 \times (\%\ formamide)$.

- **la longueur des fragments des ADN**

La Tm est plus élevée si l'ADN est long.

Calcul du Tm

- Pour un oligo-nucléotide de taille inférieure à 14 nucléotides, le calcul du Tm est :

$$Tm = (wA + xT) \times 2 + (yG + zC) \times 4$$

w, x, y et z sont le nombre de nucléotides A, T, G et C respectivement.

- Pour un fragment plus long, le calcul du Tm est:

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

N est le nombre total de nucléotides.

[Na+] la concentration en sodium du milieu d'hybridation.

PRÉPARATION DES ACIDES NUCLÉIQUES

Préparation des acides nucléiques

Extraction / Purification

Dans des conditions optimales de qualité et de quantité, L'ADN (ou l'ARN) doit impérativement être **purifié** à partir de matériels biologiques (toute cellule nucléée):

- ✓- Cellules animales ou végétales;
- ✓- Leucocytes;
- ✓- Villosités choriales;
- ✓- Cellules en culture : fibroblastes, amniocytes;
- ✓- Prélèvements anatomopathologiques;
- ✓- Tissus congelés;
- ✓- Goutte de sang;
- ✓- Racine de cheveux;
- ✓- Restes de momie, cadavre….

Principe de l'extraction

L'extraction repose sur les propriétés des AN :

- Affinité des acides nucléiques pour :

Les phases aqueuses

Solubilité différentielle entre 2 phases non miscibles

- Précipitation des acides nucléiques

(par l'éthanol ou isopropanol à froid / sels)

Le principe de l'extraction est:

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN,…)
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

Méthodes d'extraction de l'ADN

Procédé classique : phénol /chloroforme

- **Phénol : un déprotéinisant puissant qui va dénaturer et solubiliser les protéines,**
- **Chloroforme : élimine les traces de phénol**
- **Protéinase K : Dissociation des protéines nucléaires par action Protéinase K + SDS**

❑La séparation des phases aqueuse et organique peut se faire par centrifugation.

❑ **La phase aqueuse contient les acides nucléiques**.

Les acides nucléiques peuvent être finalement récupérés sous forme solide à la suite de précipitation par l'alcool éthylique ou par l'alcool isopropylique

- **Méthodes aux sels**
- **Méthodes automatiques**

Qualité
et quantification de l'échantillon d'ADN

Qualité

DO260/DO280 doit être compris entre **1,8 et 2**.

S' il est inferieur à 1,8, il reste trop de protéines.

S'il est supérieur à 2, l'ADN est dégradé.

La dégradation de l'ADN peut être observée après électrophorèse sur gel d'agarose en présence de BET.

Les petits fragments issus de la dégradation migrent loin.

Quantification de l'ADN

1 unité DO260nm correspond à une [ADN]= 50µg/ml.

Extraction de l'ARN

Extraction

- ✓ Le principe est le même que pour l'ADN (extraction, précipitation).
- ✓ Les ARN sont très instables,
- ✓ des molécules stabilisantes comme la RNAsine sont ajoutées.

Quantification

- 1 unité DO260 correspond une concentration de à 30µg/ml.

Qualité de l'échantillon

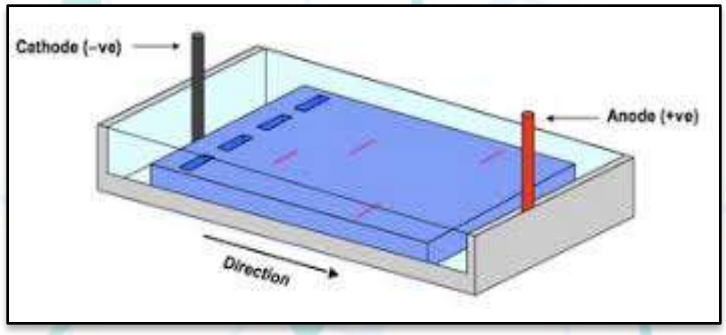
Par électrophorèse en gel d'agarose et BET, on visualise l'état de dégradation des ARN.

SÉPARATION DE FRAGMENTS D'ADN

ELECTROPHORÈSE

SÉPARATION DE FRAGMENTS D'ADN

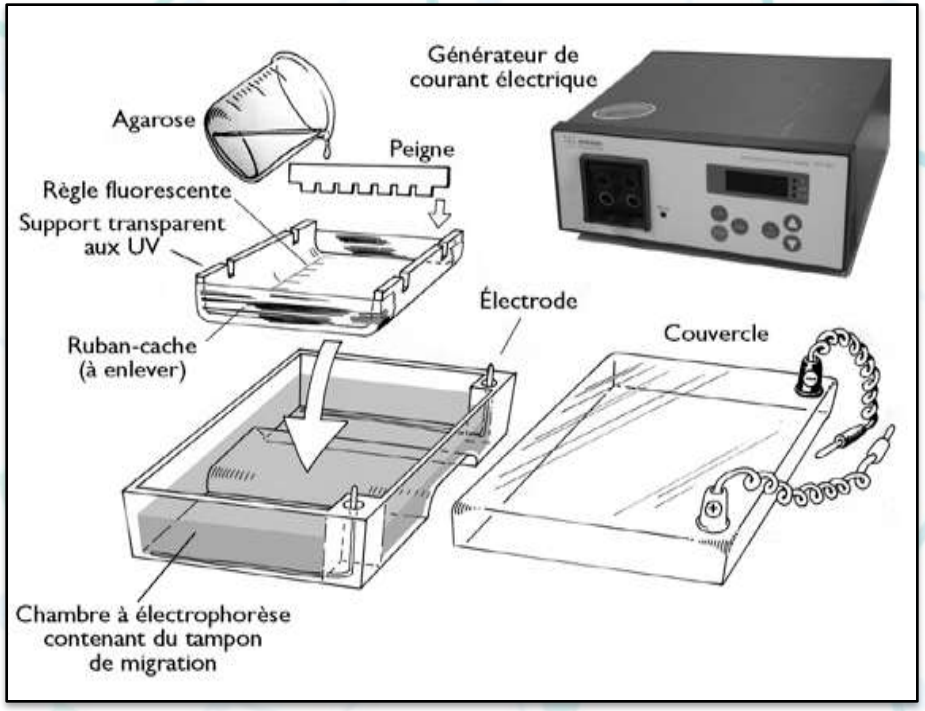
- **A pH 7,** l'ADN étant chargé négativement (H^2PO^- $2H^+ + PO^{42-}$), se déplace dans le gel d'agarose sous l'action d'un champ électrique.



- La séparation des fragments d'ADN est basée sur deux paramètres :

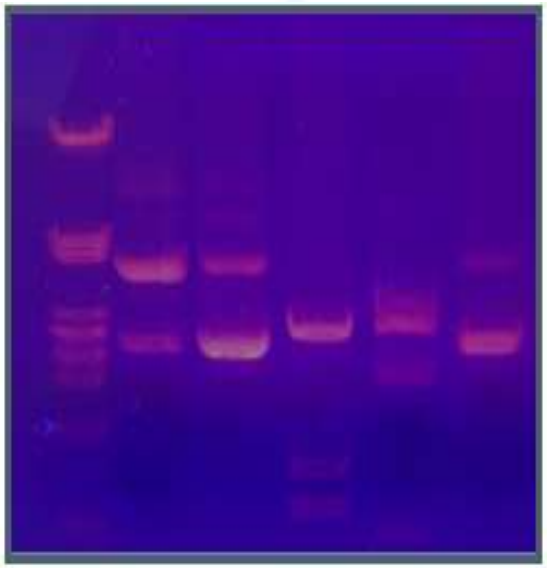
  – **La taille** : plus un fragment est grand et plus il est retenu dans les mailles du gel ;

  – **La structure tridimensionnelle** : deux molécules de même taille avec des structures 3D (tridimensionnelle) différentes ont un encombrement différent.



Révélation de l'ADN

C’est une révélation au **bromure d'ethidium (BET) :**



- **agent d'intercalation utilisé comme** marqueur d'acide nucléique;
- exposé au rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent couleur **rouge-orangée**,
- 20 fois plus intense lorsqu'il est lie a l'ADN.

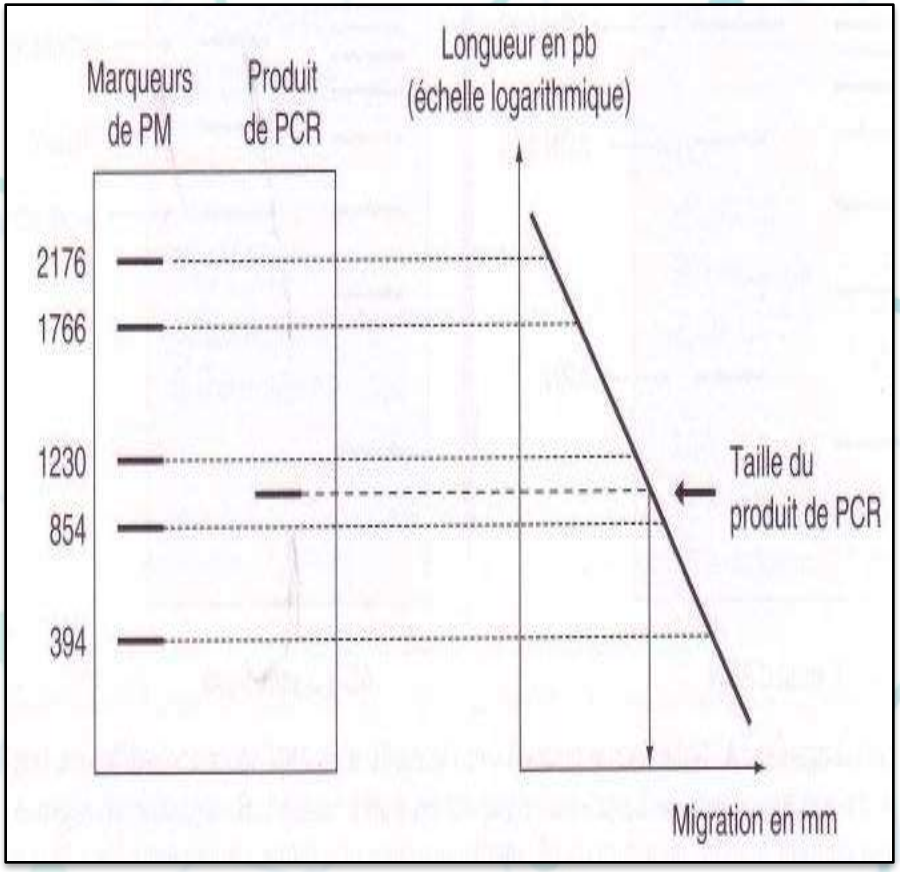
Analyse du résultat

Un marqueur de taille composé de plusieurs fragments de taille et de quantité connue, est déposé en parallèle de l'échantillon à analyser pour estimer la taille des fragments ADN.

Après migration électro-phorétique, une courbe d'étalonnage est tracée:

[log (taille du marqueur) =f(distance de migration du marqueur)]

pour déterminer de manière précise la taille des fragments à analyser.



Electrophorèse de l'ADN

Figure 11.2 Schéma de principe d'une électrophorèse.
Dépôt A pour les marqueurs de poids, dépôt B pour l'échantillon.

Applications de l’électrophorèse

- Séparation de fragments ADN digérés;
- Estimation du poids moléculaire de fragment d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction;
- Analyse d'ADN après une amplification par PCR.

Facteurs affectant la migration

- **la longueur de la molécule d'ADN;**

- **la concentration du gel**

L'augmentation de la concentration d'agarose dans un gel réduit la vitesse de migration.

- **le voltage**

plus le voltage est important, plus la vitesse de migration augmente.

- **La conformation de l'ADN**

ADN circulaire, ADN linéaire et ADN super-enroulé.

LES TECHNIQUES DE BASE D'ANALYSE DE L'ADN

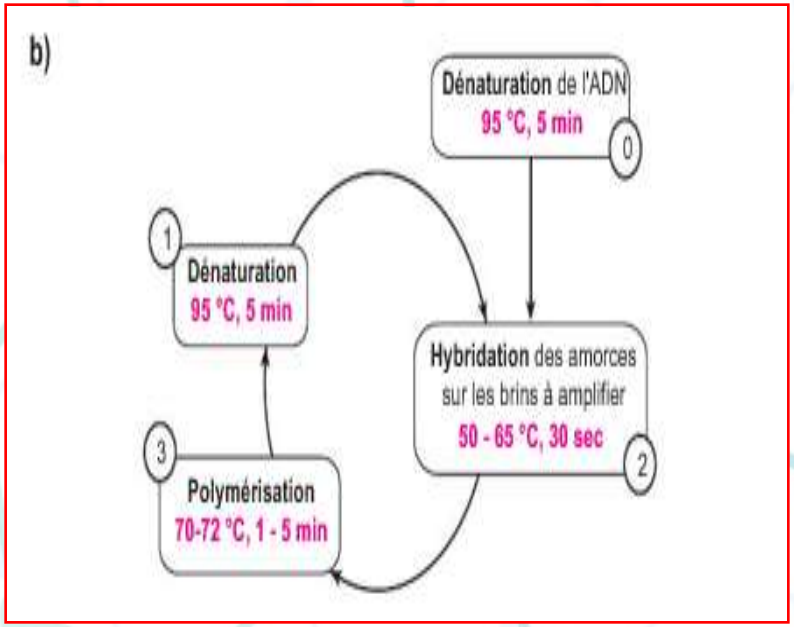
PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

PCR (Polymerase Chain Reaction)

1.Principe

PCR est l'amplification in vitro d'un fragment d'ADN voulu

Des cycles successifs de dénaturation, d'hybridation des amorces et d'élongation sont effectués.



-**Les amorces** sont des oligonucléotides qui se lient spécifiquement de part et d'autres de la séquence à amplifier.

- **L'oligonucléotide sens** est complémentaire de la séquence 5'-3' (en 5' du fragment à amplifier).

- **L'oligonucléotide antisens** est complémentaire de la séquence 3'-5' (en 3' du fragment à amplifier).

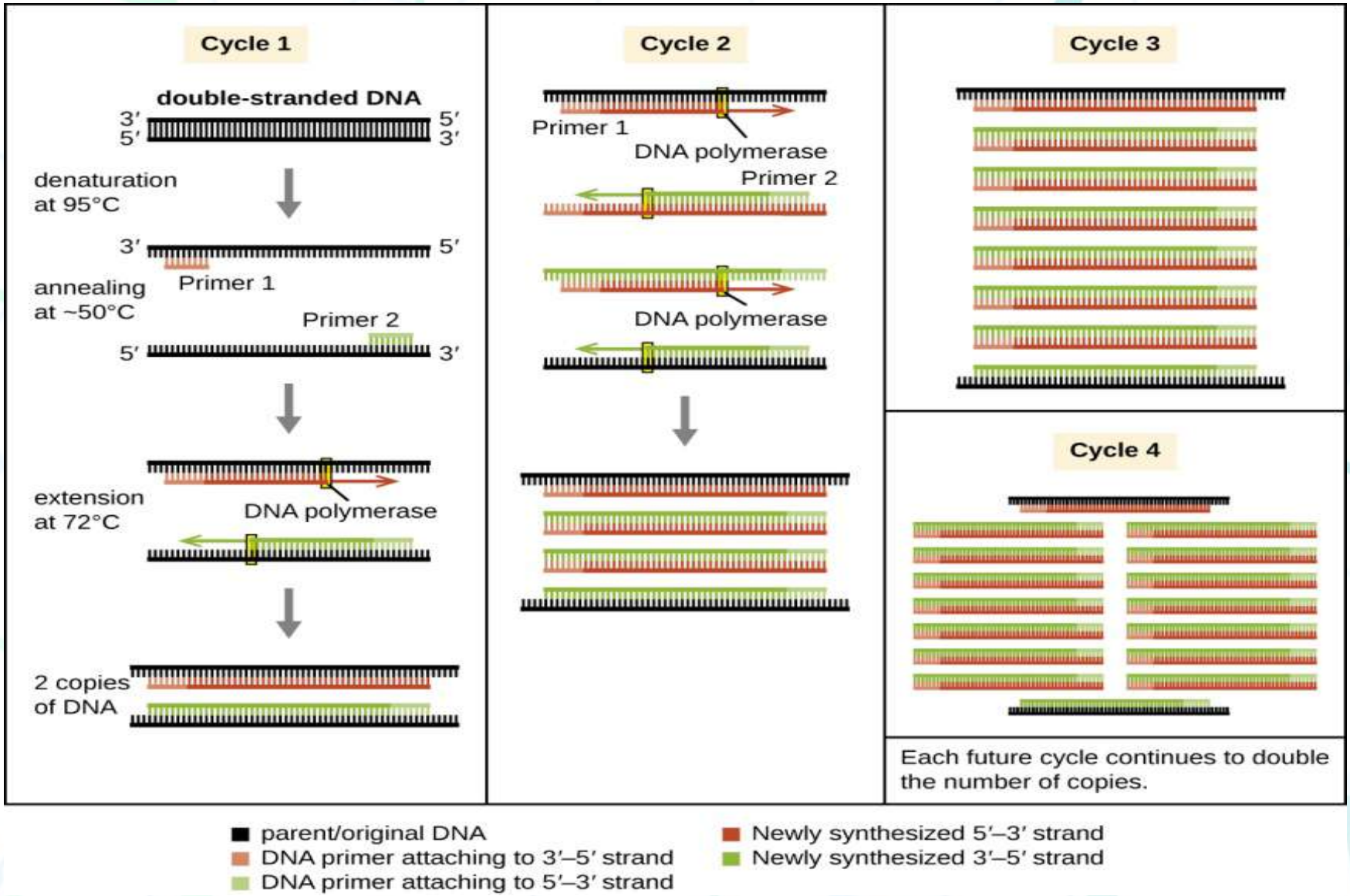
-**La Taq Polymérase** : C'est ADN polymérase thermostable qui a une activité optimale à **68-72°C** en présence de **Mg2+ et de dNTP.**

2. Les acteurs de la PCR

PCR dépend de la présence de :

- **Deux amorces d'ADN en excès** :
- **Une Taq polymérase thermostable résistante**
- Les quatre désoxy-nucléosides triphosphates **en excès** (dNTP) : dATP ; dCTP ; dGTP ; dTTP ;
- **le chlorure de magnésium**
- Une solution **tampon** contenant du chlorure de potassium et du chlorure de sodium

3. Les étapes de la PCR



4. Optimisation de la PCR en fonction de la séquence à amplifier

L'optimisation repose sur plusieurs critères:

- le choix des amorces,
- la température de fusion
- la concentration en $MgCl_2$

5. Intérêt de la PCR

- Amplification d'ADN.
- Méthode de base pour différentes techniques de biologie moléculaire:
  - Diagnostic génétique (detection de mutation)
  - Séquençage
  - Détermination de polymorphisme (RFLP…)
  - Transcription reverse (RT)-PCR
  - Clonage de gènes ou de fragments de gène

6. Les variantes de la PCR

- PCR multiplex
- PCR nichée (Nested)
- Hot-Start PCR
- Touch-down PCR
- PCR spécifique d’allèles
- RT-PCR(reverse transcriptase).
- PCR en temps réel

7-Purification des amplicons ou produits PCR

- Pour obtenir des produits PCR de bonne qualité; Il faut utiliser une membrane de filtration:
  - L'ADN reste fixé sur une membrane de filtration
  - les contaminants passent au travers la membrane et éliminés :
    - **les dNTPs libres non incorporés,**
    - **les amorces en excès,**
    - **le MgCl2,**

Les techniques d'hybridation des acides nucléiques

Ces techniques reposent sur les propriétés physico-chimiques des acides nucléiques:

- **la complémentarité des bases constitutives** de l'ADN (A/T, G/C) et de l'ARN (A/U, G/C);
- La **température Tm** à laquelle les deux brins d'ADN se séparent est propre à chaque séquence.

- **la réversibilité** du processus de séparation des deux brins d'une molécule d'ADN (dénaturation) et de réassociation des deux brins (renaturation).
  - **Les dénaturations :** dissociation des brins d'ADN (à 100°C ou à pH alcalin) rupture des liaisons hydrogènes.
  - La **renaturation** : reformation des liaisons hydrogènes entre les deux brins. on parle d'hybridation:

3. Types d’hybridation :

L'objectif de l'hybridation est:
la détection de la présence d'un acide nucléique d'une séquence donnée par l’utilisation d’un fragment d’ADN complémentaire = sonde.

Cela peut avoir lieu en solution ou sur support solide (immobilisation de la cible sur une membrane [nitrocellulose, nylon], sur verre, colonies bactériennes, chromosomes, plage de lyse ...etc.).

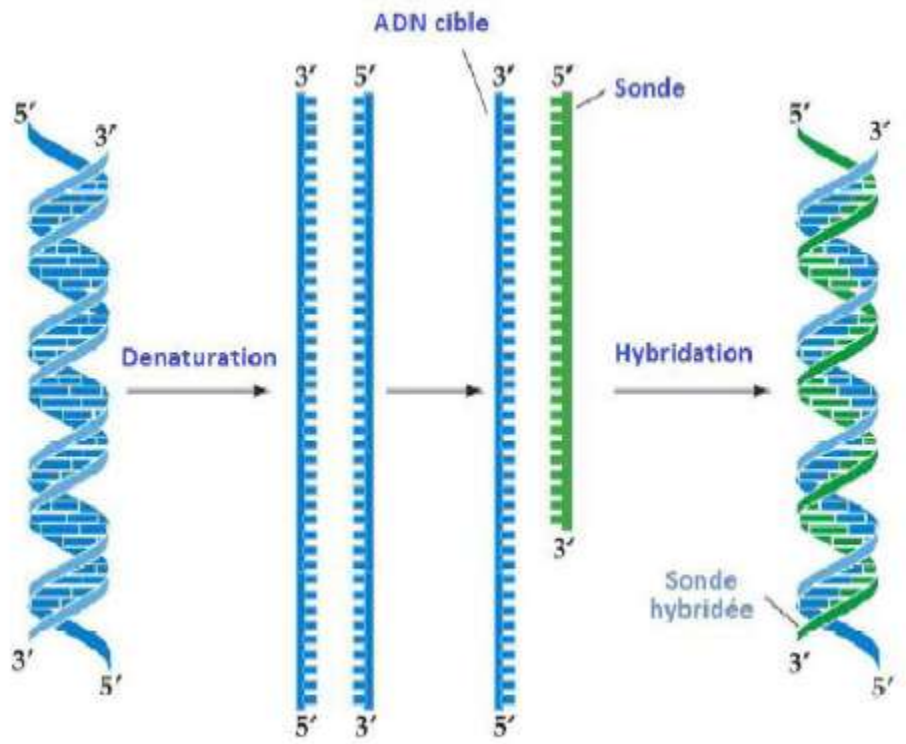


Figure 1: Hybridation des acides nucléiques (Passarge, 2007).

Hybridation d'ADN sur support liquide

Les segments complémentaires sont placés dans une solution contenant un tampon et de la formamide. L'agitation thermique assure la liaison entre les fragments complémentaires.
Cette température est généralement inférieure de 15°C à la Tm de l'ADN concerné.

Les hybrides formés sont quantifiés selon trois méthodes :

1. les méthodes spectro-photométriques (la diminution en DO à 260nm est due à l'augmentation du taux des hybrides);
2. la technique de la nucléase S1 (digestion des ADN et ARN simples brins);
3. La chromatographie sur hydroxylapatite (Seuls les doubles brins se fixent en raison d'une forte concentration en sels).

Hybridation d'ADN sur support solide : Southern blot

La séquence complémentaire cible est fixée (immobilisée) sur un support **solide**. Cette méthode facilite la séparation des fractions hybridées de celles non hybridées.

Cependant, la vitesse d'hybridation est nettement inférieure à celle de la phase liquide (jusqu'à 10 fois)

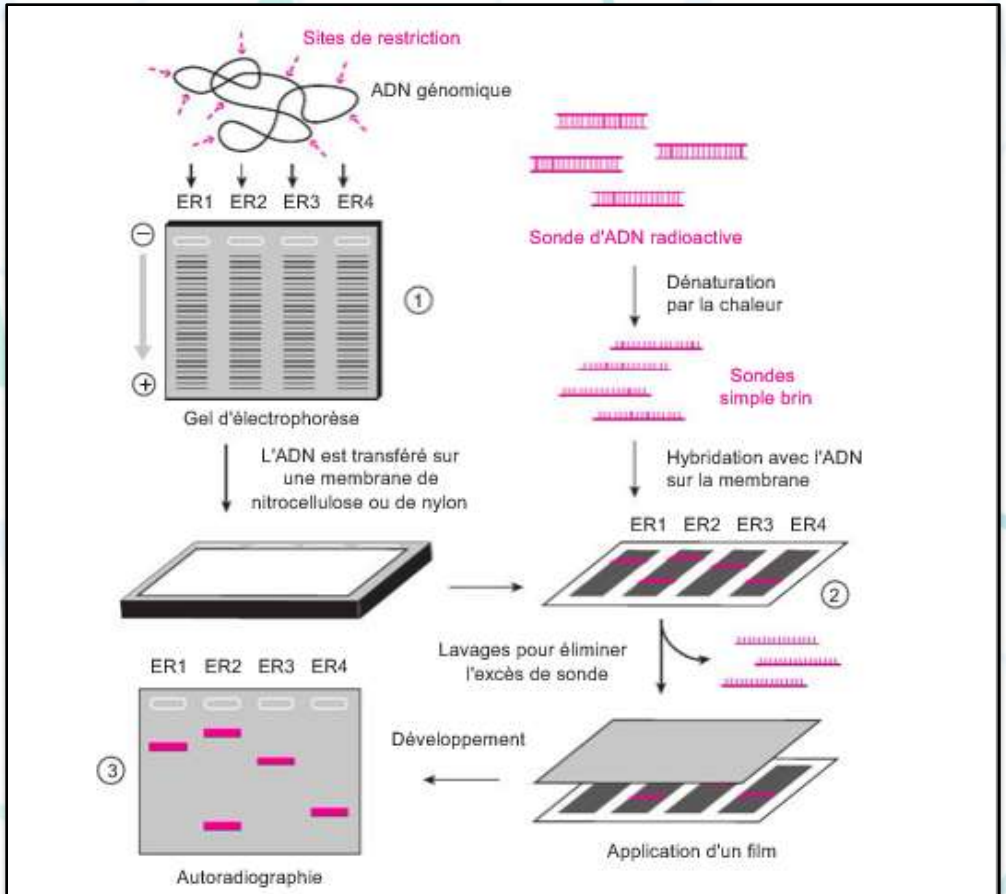


Figure 6-14 Principe de la technique de transfert-hybridation de Southern. Les très nombreux fragments d'ADN sont préalablement séparés par électrophorèse et repérés avant d'être transférés sur la membrane où ils sont invisibles, sauf en lumière UV où ils apparaissent sous la forme d'une traînée continue (1). Seuls les fragments reconnus après hybridation par la sonde (2) seront révélés par autoradiographie (3). ER1 à ER4 : différents enzymes de restriction.

plusieurs types de supports

- La **nitrocellulose** :
- Les membranes synthétiques (à base de **nylon**)

Hybridation in situ (HIS):

Cette méthode permet de localiser

un ARNm dans le cytoplasme

Un ADN dans le noyau de cellules isolées ou au sein d'un tissu.

Elle nécessite une sonde capable de s'hybrider à une séquence cible;

La détection directe de la sonde grâce au marquage révèle la localisation de la cible recherchée au sein:

d'un organisme entier,

d'un ensemble de cellules,

dans un compartiment subcellulaire

sur un chromosome précis.

Le séquençage des acides nucléiques

1- Principe

La méthode de séquençage la plus utilisée est celle de Fred Sanger (méthode de référence)

- Sanger utilise des didésoxynucléotides terminateurs radioactifs.
  - Les 4 didésoxynucléotides radioactifs sont marqués au ^{35}S (Soufre marqué 35)
  - Il est nécessaire de réaliser 4 réactions en parallèle, chacune utilisant un terminateur.
  - Les produits de ces réactions sont séparés par électrophorèse. La séquence est lue à partir d'un film auto-radiographique de bas en haut (les fragments les plus petits migrent le plus loin sur le gel)

Structure du ddNTP

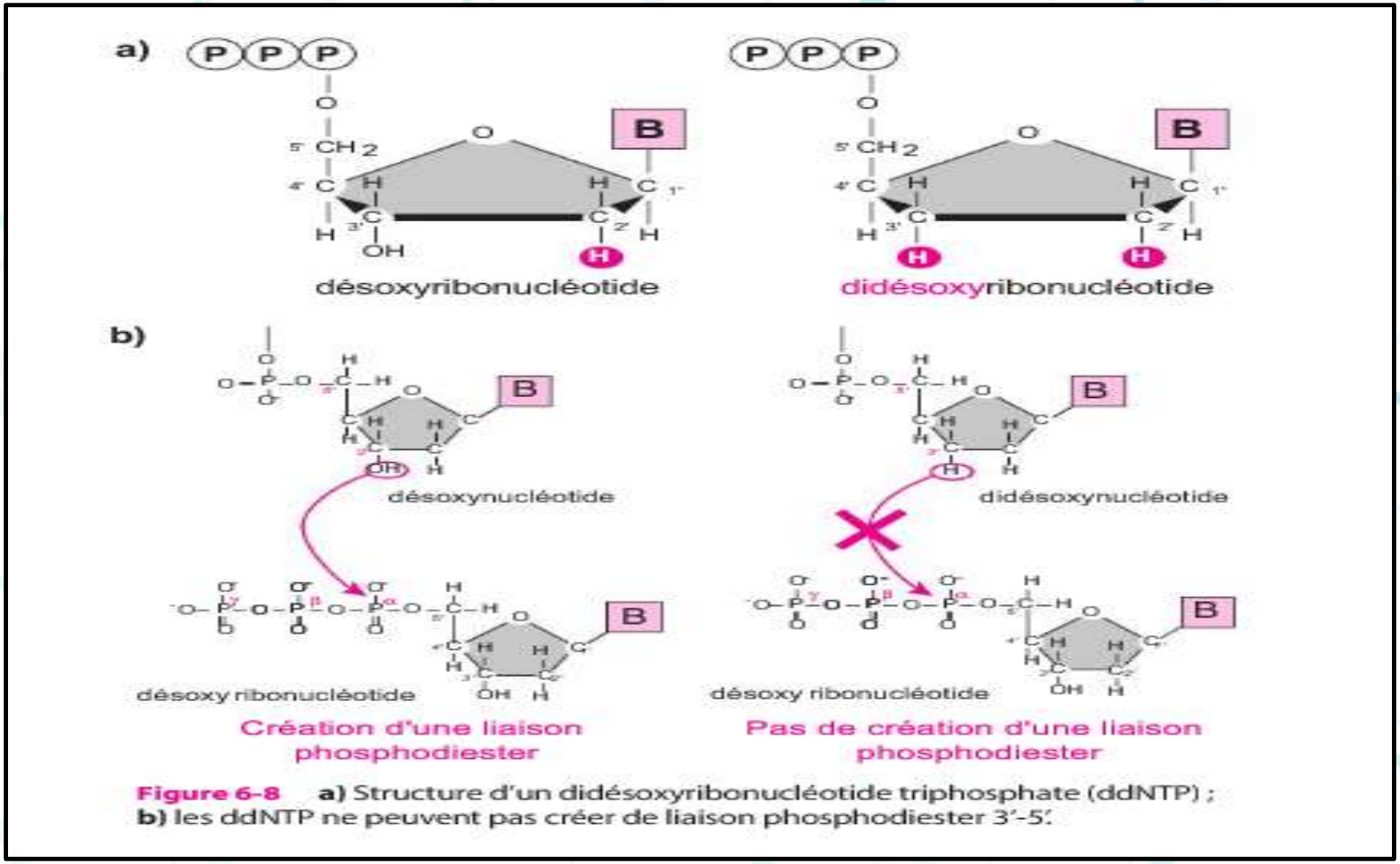


Figure 6-8 **a)** Structure d'un didésoxyribonucléotide triphosphate (ddNTP) ; **b)** les ddNTP ne peuvent pas créer de liaison phosphodiester 3'-5'.

Principe du séquençage Sanger

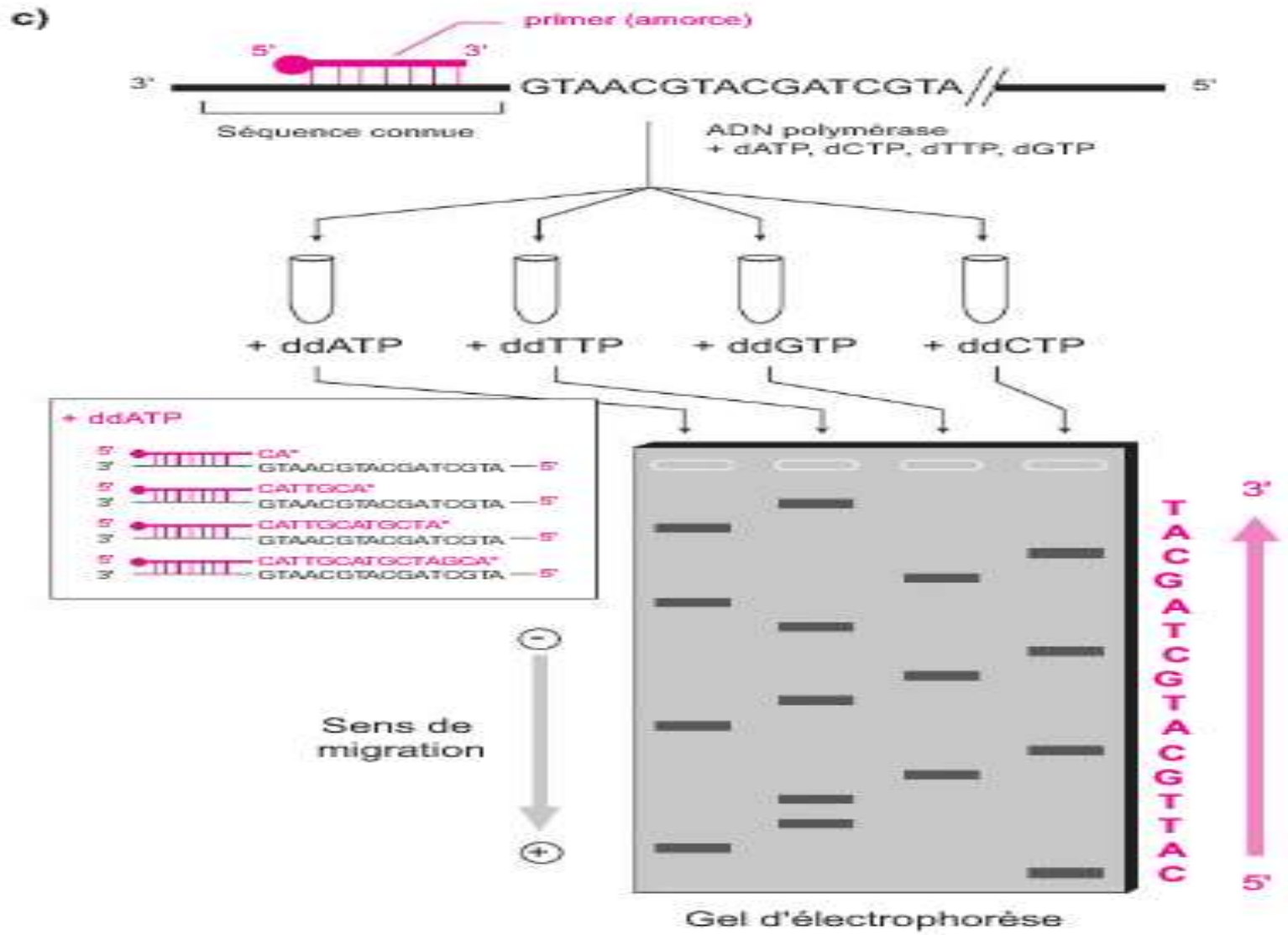
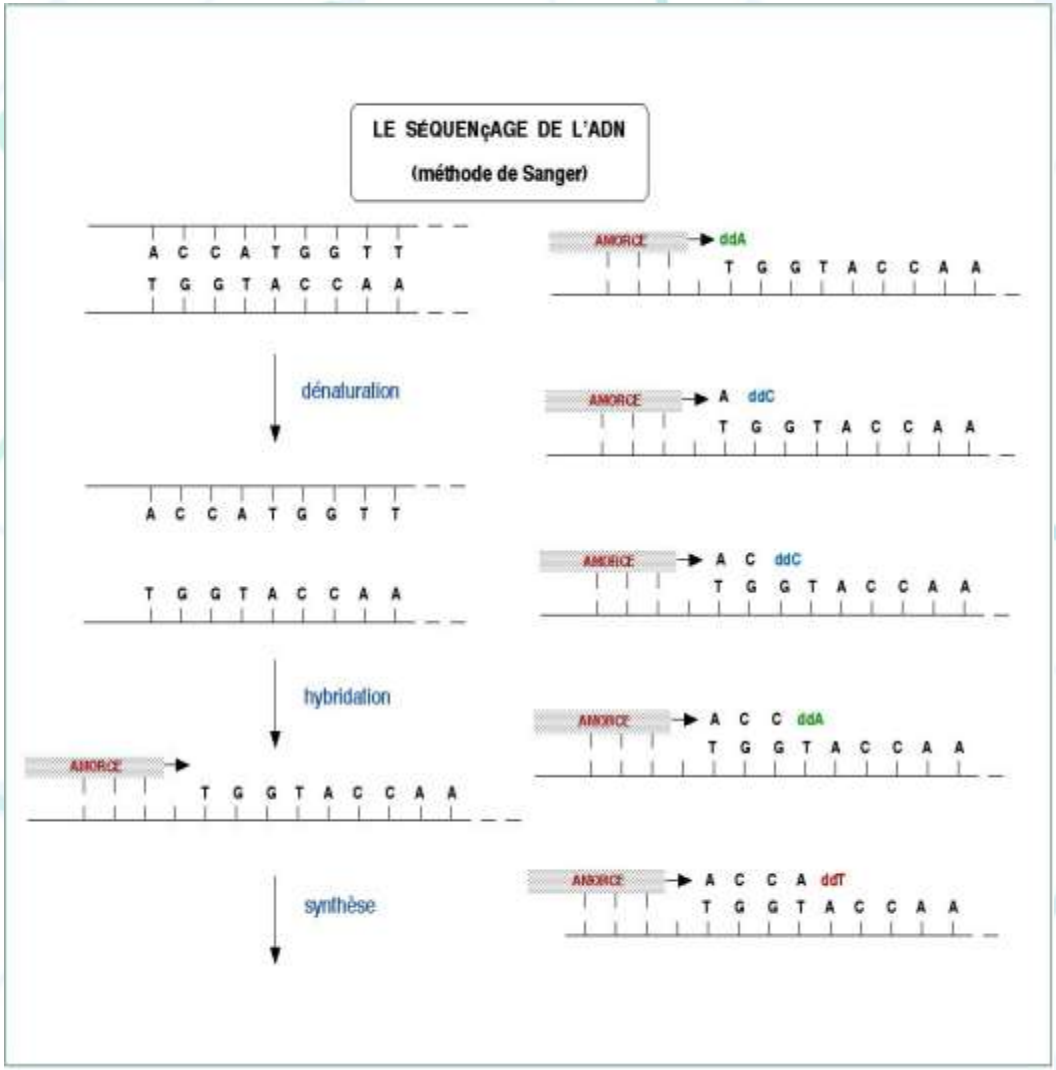


Figure 6-8 *(suite)* **c)** principe du séquençage de l'ADN selon la méthode de Sanger en présence des 4 ddNTP. Noter que la séquence établie expérimentalement est la séquence complémentaire de la séquence initiale à déterminer.

2- Etapes du séquençage

Elle est caractérisée par une **succession** d'étapes :

- ✓ la séparation des deux brins d'ADN,
- ✓ l'hybridation d'une amorce marquée par un élément radioactif ou un dérivé fluorescent,
- ✓ une polymérisation par une ADN polymérase en présence de didésoxy Ribonucléosides triphosphate (ddNTP)
- ✓ L'incorporation du ddNTP entraine l'arrêt de la polymérisation



Automatisation du séquençage

Actuellement, la réaction se fait avec **4 terminateurs marqués** par des **fluorochromes** distincts, qui seront utilisés dans la même réaction.

Les **fluorochromes** émettent, après excitation par un faisceau **laser**, des signaux fluorescents de **couleurs différentes**.

ddNTP	fluorophore	couleur
ddATP	JOE	Vert
ddCTP	5-FAM	Bleu
ddGTP	TAMRA	Jaune
ddTTP	ROX	Rouge

Electrophorèse capillaire des acides nucléiques

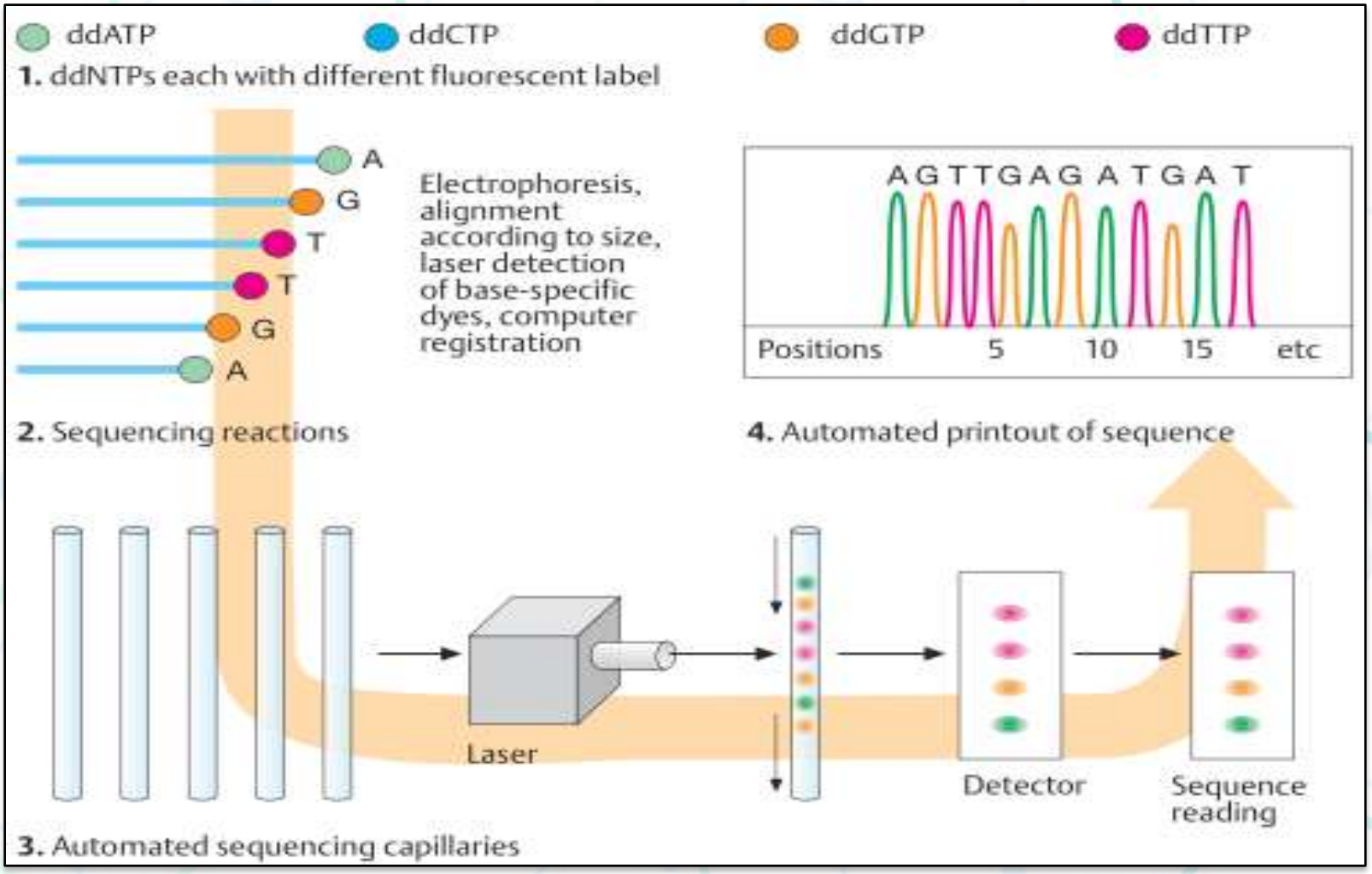
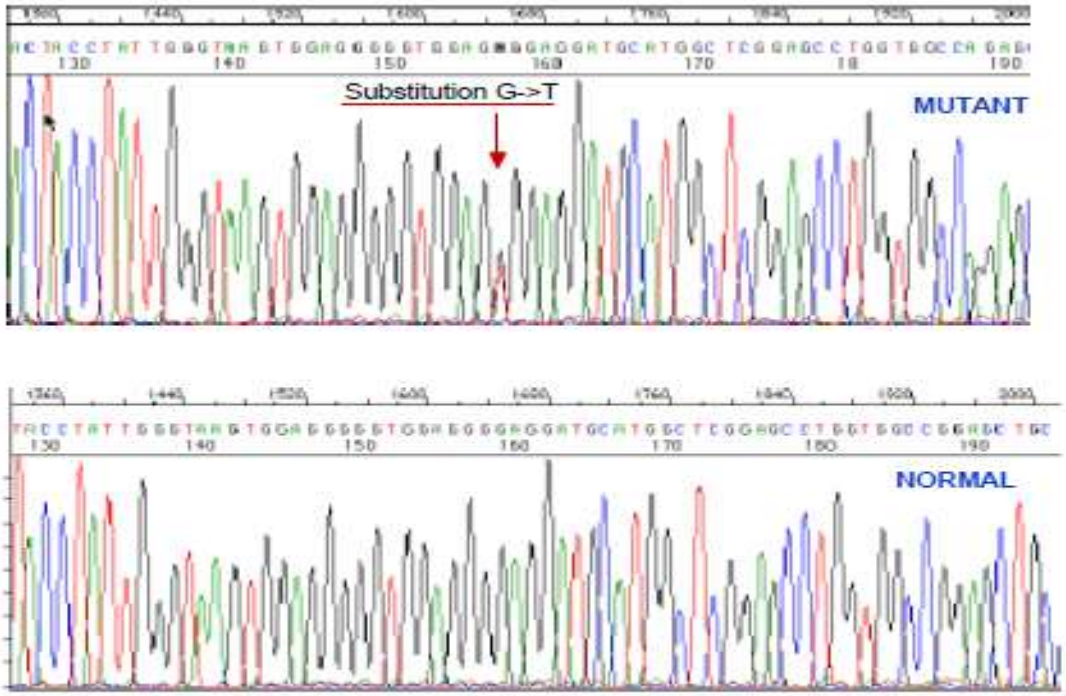


Figure . Electrophorèse capillaire des acides nucléiques

Analyse des résultats



Les nouvelles techniques de séquençage

- Il existe plusieurs techniques de séquençage avec de nouvelles applications

Tableau 6.3 Exemples d'applications des technologies de séquençage à haut débit

Application	Exemple
Reséquençage* de génomes	Recherche de polymorphismes à l'échelle du génome entre individus, recherche de nouvelles mutations, analyse fine de gènes.
Reséquençage* de régions ciblées	Identification de nouveaux polymorphismes ou de mutations causales.
Métagénomique	Identification d'une flore bactérienne au sein d'une niche environnementale particulière.
Séquençage du transcriptome	Analyse de l'expression des gènes à l'échelle du génome, identification de transcrits rares.
Séquençage des petits ARNs	Identification par séquençage de petits ARN de type micro ARN et ARN non codants (ARN transcrits mais non traduits en protéines).
Séquençage après immunoprécipitation de la chromatine (ChiP-Seq)	Cartographie, à l'échelle du génome, des sites d'interaction entre l'ADN et les protéines régulant l'expression des gènes.

* Le reséquençage suppose déjà connue la séquence génomique de référence.

Applications

- Diagnostic moléculaire des maladies héréditaires;
- Diagnostic chez les apparentés à risque
- Diagnostic prénatal……..