



Université de Djilali LIABES
Faculté de médecine TALEB MOURAD
département de médecine
2 année médecine 2024/2025

LES OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

Dr HABBATI. H
Maitre assistante en histologie, embryologie
et génétique cliniques

INTRODUCTION

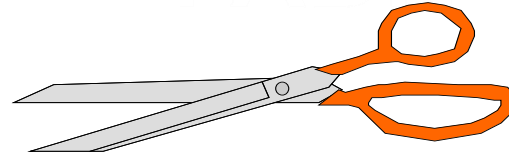
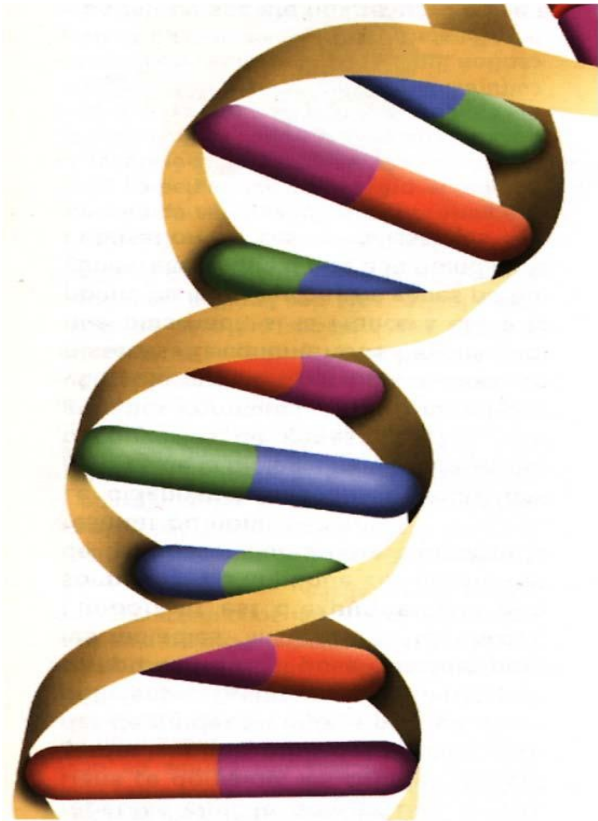
- La biologie moléculaire consiste à étudier la structure des gènes, leur expression et le contrôle de leur expression.
- Elle conduit donc à travailler essentiellement avec des molécules d'ADN, et d'ARNm.
- Les techniques d'étude de l'ADN sont devenues si performantes qu'il est actuellement courant d'isoler le segment d'ADN correspondant à n'importe quel gène spécifique.

Matériel biologique
et outils enzymatique
de biologie moléculaire

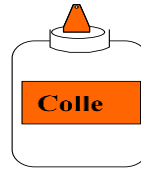
1-Extraction et purification du matériel génétique

- matériel présent dans :
- les virus, les bactéries et les cellules
- **ADN des cellules eucaryotes animales = ADN nucléaire + ADNmit**
source : sang, tissus (biopsies), cultures cellulaires...
- **ARN = ARNm, ARNt, ARNr**
 - ❖ sensibilité aux RNAses
 - ❖ spécificité tissulaire des ARNm (ADNc) = on peut le transcrire en ADNc pour une meilleure stabilité

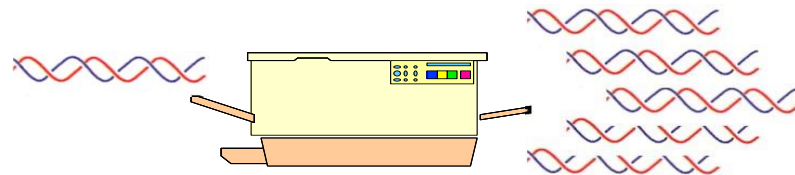
.2-Des outils enzymatiques pour étudier l'ADN



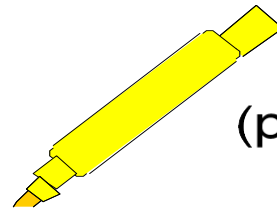
(endonucléases, DNAses...)



(ligases)



(polymérases...)



(polymérases, kinases...)



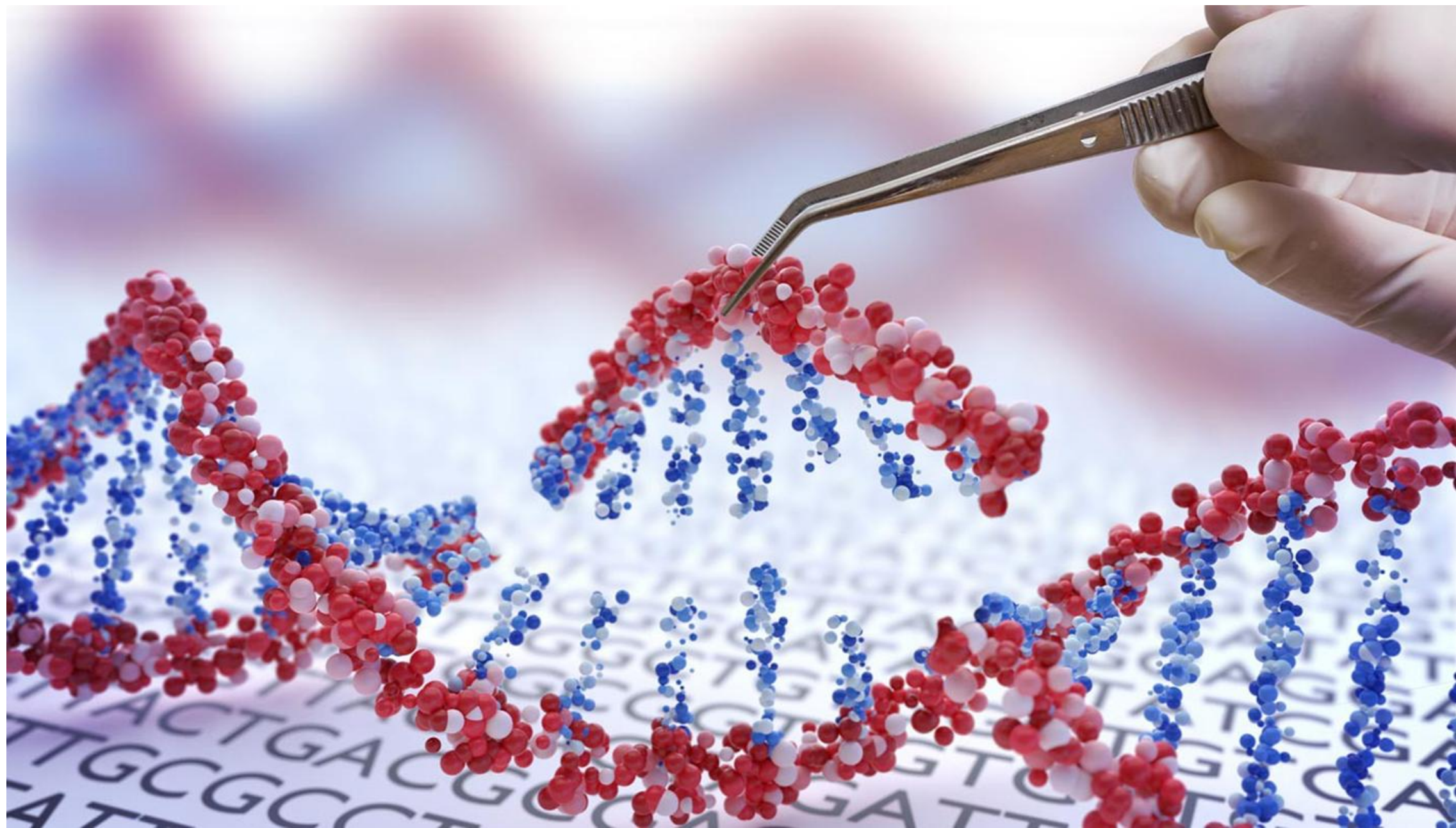
(polymérases...)

2-1 Couper

- **2.1. Enzymes de restriction**

- *D'origine bactérienne*
- *Endonucléases*
- *Ils ont la particularité de couper l'ADN bicaténaire à des sites spécifiques de la séquence*

- Produites naturellement par les bactéries comme moyen de défense contre les phages (virus bactériens). Ces enzymes coupent l'ADN étranger, mais protègent leur propre ADN grâce à des mécanismes de méthylation. Ce système est appelé : système de restriction-modification → Endonucléase = restriction → Méthyltransférase = protection

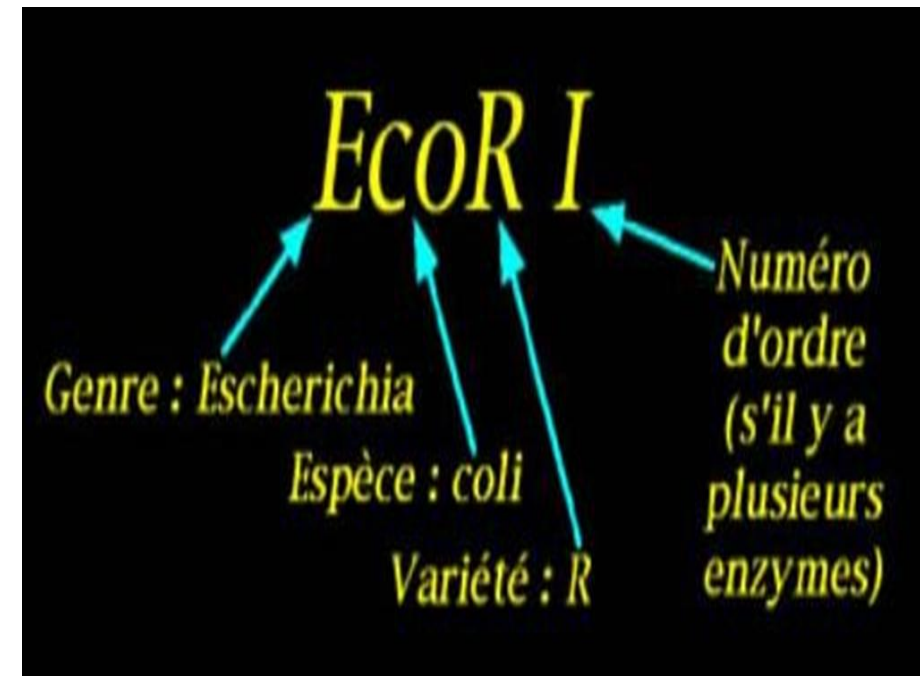


Nomenclature des enzymes de restriction

- Le nom des enzymes de restriction provient du nom **de genre** et **d'espèce de la bactérie** dont elles ont **été isolées**

ex : origine bactérienne :

Eco RI = **E**scherichia **co**li type **R** souche **I**



- Il existe trois types : I II III
- Chaque enzyme de restriction reconnaît et coupe une séquence nucléotidique donnée

Type I et III = des protéines complexes coupant l'ADN bicaténaire en dehors de leurs sites de reconnaissance

Type II = les outils indispensables en génie génétique

Type

Fonctionnement

Type I

Coupure loin du site de reconnaissance

Type II

Coupure au niveau exact du site (les plus utilisées)

Type III

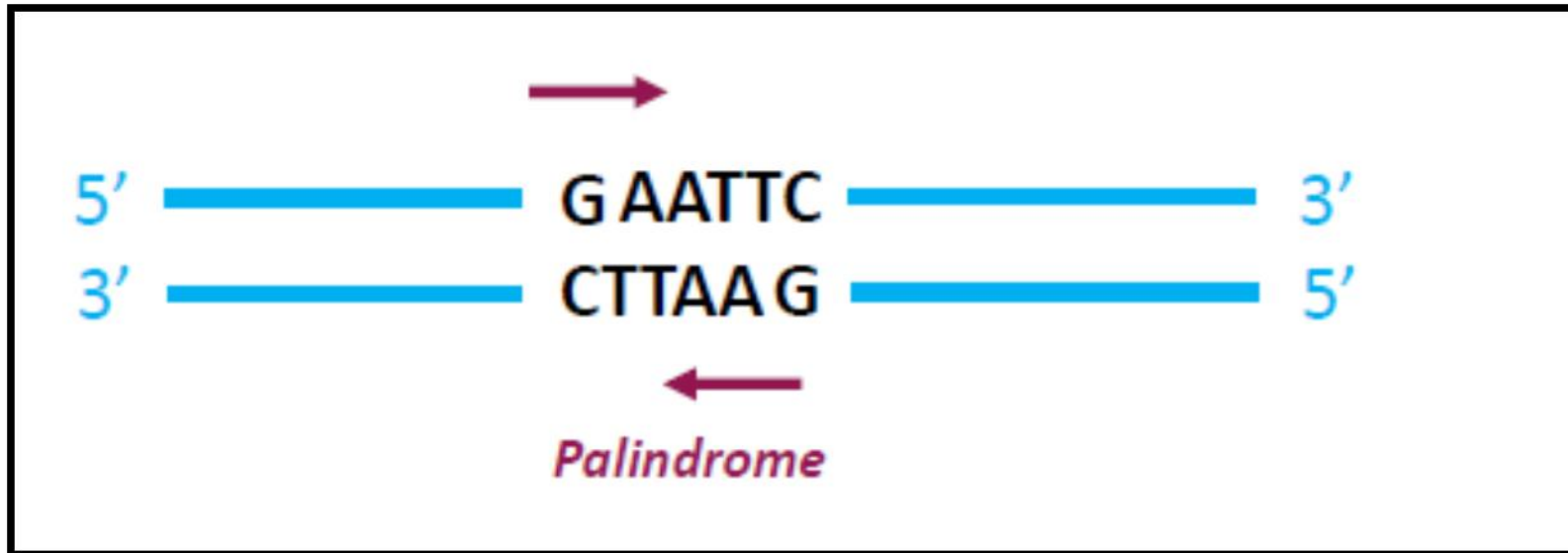
Coupure proche du site, nécessite ATP

- Elles reconnaissent une séquence spécifique de 4, 6 ou 8 paires de bases et coupent à l'intérieur de cette séquence

Appelée = **site de restriction**

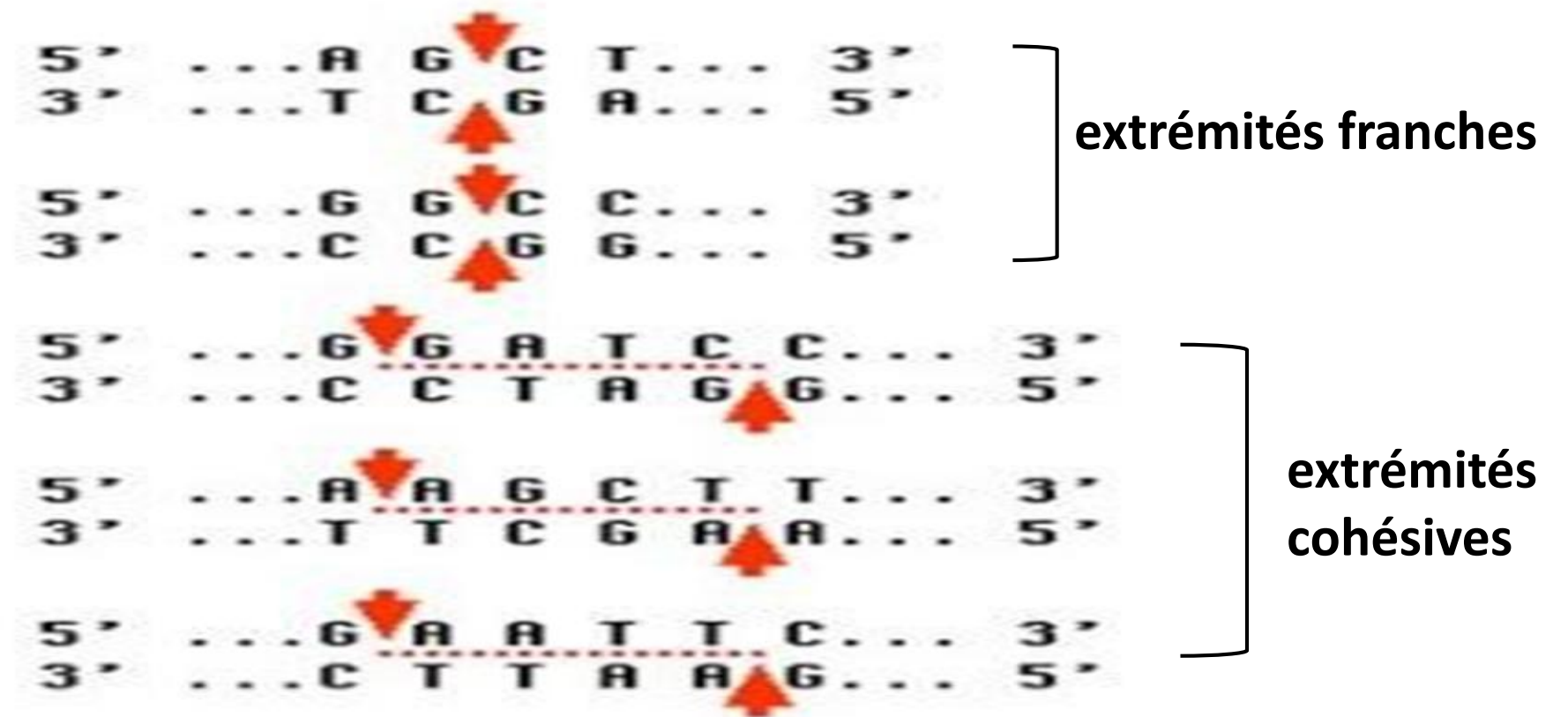
particularité = sont **palindromique**

**ces sites sont de nature palindromique ;
la lecture des deux brins complémentaires dans des sens
opposés donne la même séquence.**



Ils coupent dans la séquence selon deux modes :

- **extrémités franches** = coupure au même endroit sur les deux brins
- **extrémités cohésives** = coupure décalée sur les deux brins



Création d'extrémités franches ou d'extrémités cohésives.

Les applications des enzymes de restriction

A. Clonage moléculaire (ADN recombinant)

But : insérer un fragment d'ADN (ex : gène) dans un vecteur (plasmide).

B. Analyse d'ADN par Southern blot

But : détecter une séquence spécifique d'ADN.

C. Génie génétique

D. Cartographie des plasmides ou de l'ADN

But : établir la carte des sites de restriction d'un ADN.

E. Diagnostic génétique (RFLP) RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism

F. Empreintes génétiques (médecine légale)

G. Création de banques d'ADN : collection de fragments d'ADN insérés dans des vecteurs.

- *2.2- autre endonucléases*

- **DNAse I** : est une endonucléase non spécifique d'origine pancréatique (bovine ou humaine) qui coupe l'ADN double brin ou simple brin en hydrolysant les liaisons phosphodiester internes.

- ***nucléase S1***: est une endonucléase qui coupe uniquement
 - les brins simples d'acide nucléique ADN
 - ARN simple brin
 - aussi les zones non appariées dans une molécule double brin (boucles, extrémités, mésappariements)

Rôle principal

Détruire les parties simples brins dans les acides nucléiques

- ***RNAse A (ARN)***

- ou ribonucléase A; est une enzyme qui dégrade l'ARN simple brin) en le découpant à l'intérieur de la molécule.

- spécifique de l'ARN monocaténaire (simple brin)
- Elle ne coupe pas l'ADN
- Elle ne coupe pas l'ARN double brin

• 2.3. Exonucléases

Les exonucléases sont des enzymes qui dégradent les acides nucléiques (ADN ou ARN) à partir des extrémités d'un brin.

Contrairement aux endonucléases (comme EcoRI ou DNase I) qui coupent à l'intérieur, Les exonucléases coupent à partir de l'extrémité 5' ou 3'

$5' \rightarrow 3'$

$3' \rightarrow 5'$

2-3- Synthèse et copie

Les polymérases sont des enzymes qui synthétisent des acides nucléiques (ADN ou ARN) à partir de nucléotides.

- Elles ajoutent les nucléotides un par un à l'extrémité 3'-OH d'un brin en croissance, selon la complémentarité des bases.

Type de polymérase	Fonction principale	Synthétise
ADN polymérase (DNA pol)	Réplication ou réparation de l'ADN	ADN
ARN polymérase (RNA pol)	Transcription (copie de l'ADN en ARN)	ARN
Transcriptase inverse (RT)	Copie de l'ARN en ADN (chez rétrovirus)	ADN
Polymérases thermostables	Utilisées en PCR (ex : Taq polymérase)	ADN

ADN polymérase

- L'ADN polymérase est une enzyme qui synthétise un nouveau brin d'ADN à partir d'un brin matrice d'ADN, en ajoutant des nucléotides complémentaires

(réalisent des liaisons phospho-diester entre deux nucléotides adjacents)

- agissent en phase S du cycle
- ion Mg^{2+} -dependant
- en milieu alcalin.
- Leur t optimale d'action de 20 à 40°C

Propriété

Sens de synthèse

Besoin d'une matrice

Besoin d'une amorce

Complémentarité

Détail

Toujours 5' → 3'

Oui (brin d'ADN à copier)

Oui (extrémité 3'-OH libre)

Respect de l'appariement A-T et G-C

- **ADN polymérase** **Fonction principale**

- Pol α (alpha) Démarre la réplication avec une amorce ARN + ADN
- Pol δ (delta) Synthèse du brin retardé
- Pol ϵ (epsilon) Synthèse du brin direct (continu)
- Pol β (bêta) Réparation par excision de base (BER)
- Pol γ (gamma) Réplication de l'ADN mitochondrial

ARN polymérase

- *L'ARN polymérase est une enzyme qui synthétise un brin d'ARN à partir d'un brin d'ADN matrice, selon la complémentarité des bases.*
- *Elle assure la transcription, première étape de l'expression des gènes.*
- *Sens de synthèse Toujours 5' → 3'*

Polymérase thermostable

- *Taq polymérase :*

La Taq polymérase est une ADN polymérase thermostable, isolée de la bactérie thermophile Thermus aquaticus.

-Active à 70°C

-Stable à 94–95 °C, elle peut résister à de hautes températures (jusqu'à 95 °C)

-permet la synthèse d'ADN in vitro, notamment pendant la PCR.

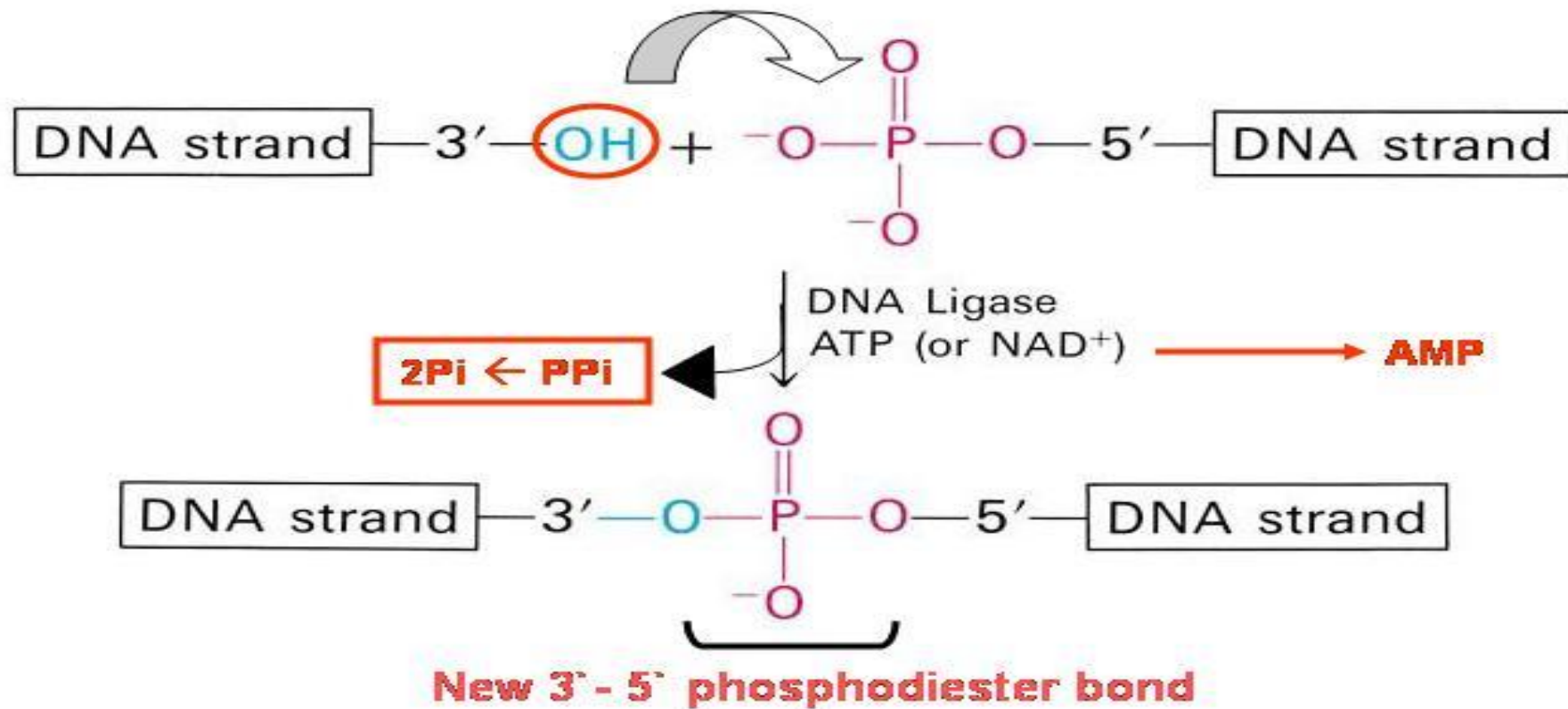
2-4-Coller

-Une ligase est une enzyme qui relie deux fragments d'ADN en formant une liaison covalente entre leurs extrémités.

*-Elle joue un rôle essentiel dans **la réparation de l'ADN** et dans **les techniques de clonage**.*

- catalyse la formation de la liaison phosphodiester entre :
- *le groupe phosphate (5'-P) d'un fragment et*
- *le groupe hydroxyle (3'-OH) du fragment adjacent*
- Cette réaction nécessite de l'énergie, souvent sous forme d'ATP (chez les eucaryotes) ou de NAD⁺ (chez certaines bactéries).

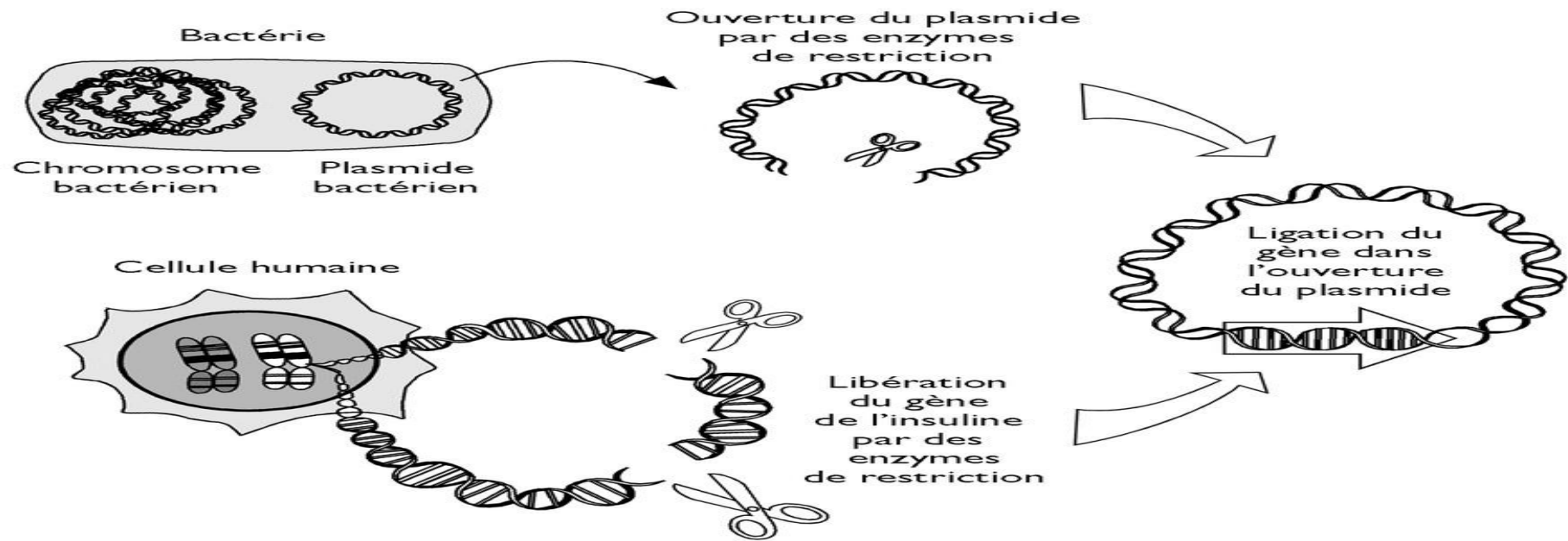
DNA LIGASE Reaction



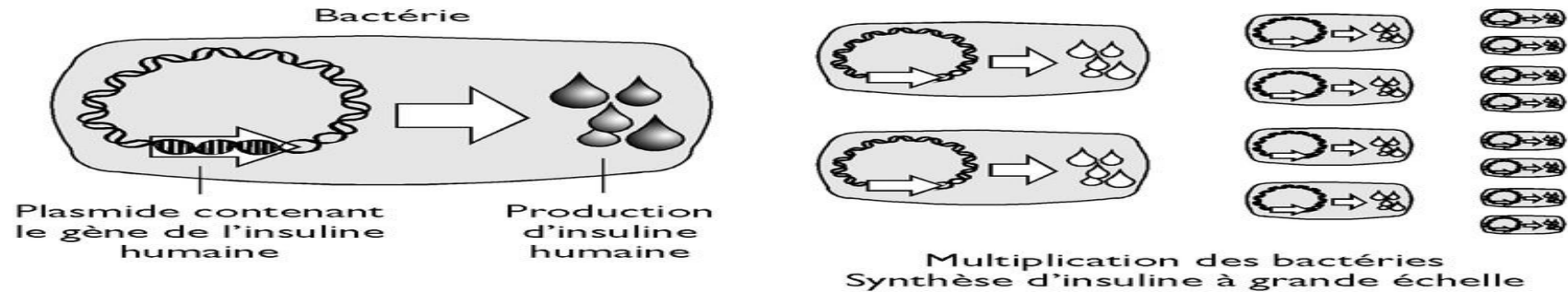
LES VECTEURS

- Un vecteur est une molécule d'ADN circulaire ou linéaire, souvent d'origine bactérienne ou virale
- capable de transporter un fragment d'ADN étranger dans une cellule hôte, où il peut être répliqué, exprimé ou conservé.

A)



B)



Production d'insuline humaine par un vecteur plasmidique

Production d'insuline humaine par un vecteur plasmidique

- 1- Isolement du gène humain de l'insuline
- 2- Insertion dans un vecteur (un plasmide)
- 3- Transformation des bactéries
- 4- Expression du gène
- 5- Purification

Résultat

- ✓ Production à grande échelle d'insuline humaine fonctionnelle
- ✓ Utilisée comme traitement pour les diabétiques
- ✓ Sans risque immunologique, car elle est humaine et non porcine

Les types de vecteurs

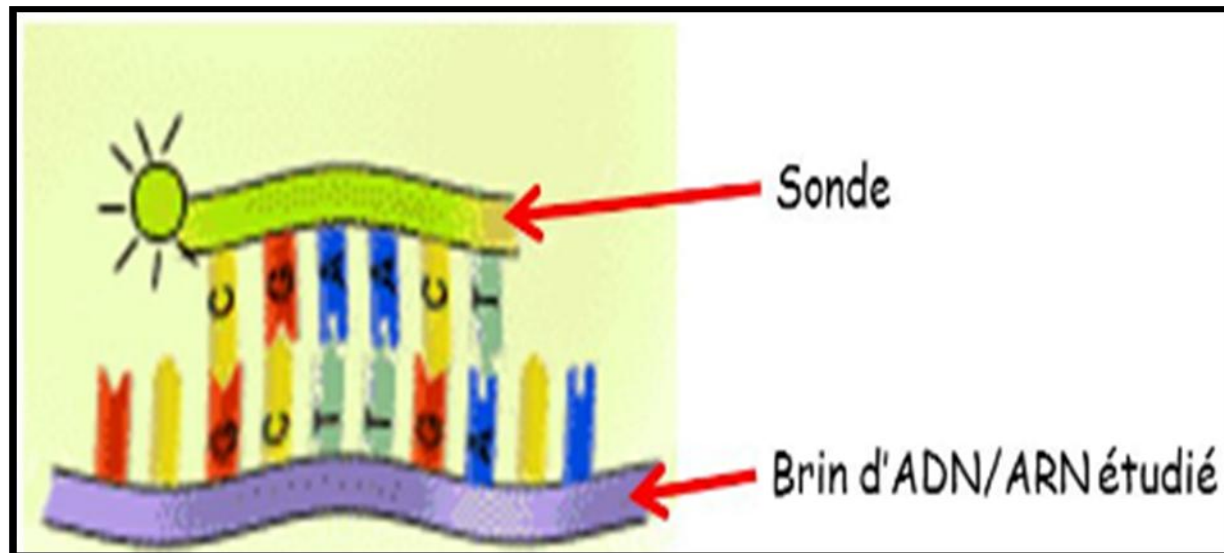
- ***Vecteur de clonage*** = molécule d'ADN souvent plasmidique capable de recevoir un fragment d'ADN étranger, de l'introduire dans une cellule hôte (souvent une bactérie), et de permettre sa réplication
- Il sert à amplifier (cloner) un gène ou un fragment d'ADN donné.
- ***Vecteur d'expression*** = vecteur ADN souvent plasmidique conçu pour permettre l'expression (transcription + traduction) d'un gène inséré dans une cellule hôte (bactérie, levure, cellule eucaryote...).
- Il ne sert pas seulement à cloner un gène, mais aussi à produire la protéine correspondante.

- **Vecteur d'intégration** =(souvent viral ou modifié) qui permet *l'intégration stable d'un gène étranger dans le génome de la cellule hôte.*
- Contrairement aux vecteurs classiques (ex. plasmides) qui restent hors du génome), les vecteurs intégrés s'incorporent dans l'ADN chromosomique.

Les sondes

DEFINITION

- Une sonde est un fragment court d'ADN ou d'ARN simple brin, marqué (radioactif, fluorescent, etc.), e
- conçu pour reconnaître une séquence complémentaire spécifique sur un acide nucléique cible (ADN ou ARN).



Rôle principal de la sonde

- Se fixe spécifiquement à une séquence complémentaire de la molécule cible
- Permet la détection de cette séquence grâce à un signal visible Sert à identifier des gènes, détecter des mutations, etc.

Type de sonde

Description

Sonde ADN

ADN simple brin (naturel ou synthétique)

Sonde ARN (riboprobe)

Transcrite in vitro à partir d'un gène

Oligonucléotide synthétique

Courte séquence (15–30 bases)

Sonde à double brin (rare)

Brin marqué + brin non marqué

Sonde plasmidique/cosmide

Fragment cloné d'un gène (long)

Marquage des sondes

- Les plus fréquents :

Type de marquage	Signal détecté	Méthode de détection
• Radioactif (P^{32} , S^{35})	Rayonnement	Autoradiographie
• Fluorescent fluorescence	Lumière émise	Microscope à

TECHNIQUES EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

Hybridation moléculaire

- **Principe :**

L'hybridation moléculaire est une méthode qui repose sur la capacité de deux brins d'acides nucléiques (ADN ou ARN) à s'apparier spécifiquement grâce à des liaisons hydrogène entre les bases.



→ Elle permet de reconnaître une séquence cible grâce à une sonde complémentaire marquée.

Les étapes du protocole

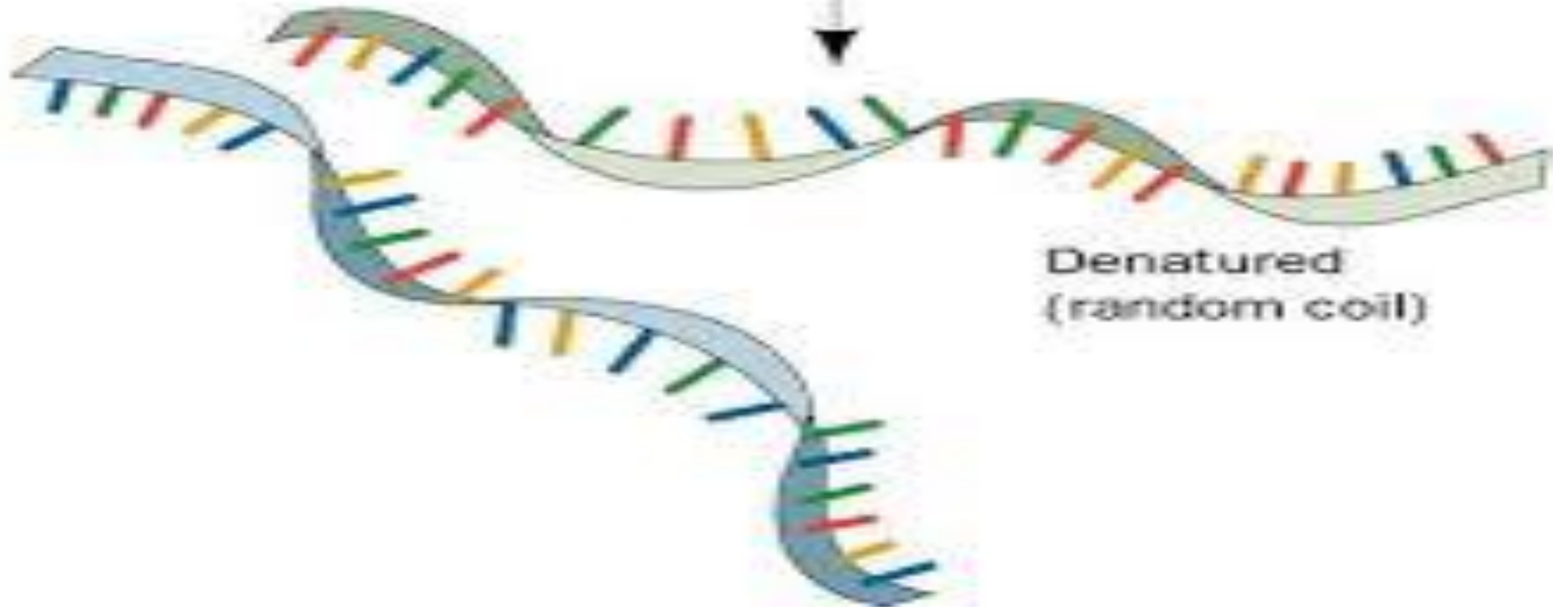
- A. Préparation de la cible
- *Extraction de l'ADN ou ARN cible*
- *Fixation sur une membrane (nitrocellulose, nylon...) ou sur une lame (in situ)*
- *Dénaturation thermique ou chimique*

- *La dénaturation de l'ADN ou de l'ARN*

- est le processus par lequel les deux brins complémentaires d'un acide nucléique se séparent suite à la rupture des liaisons hydrogène entre les bases azotées.



Native (double helix)



Denatured
(random coil)

- La dénaturation se fait par :

Le PH

La température

Certains solvants

Méthodes de dénaturation

Dénaturation thermique :

Chauffage à 90–100 °C (souvent ~95 °C) pendant quelques minutes.

Dénaturation chimique :

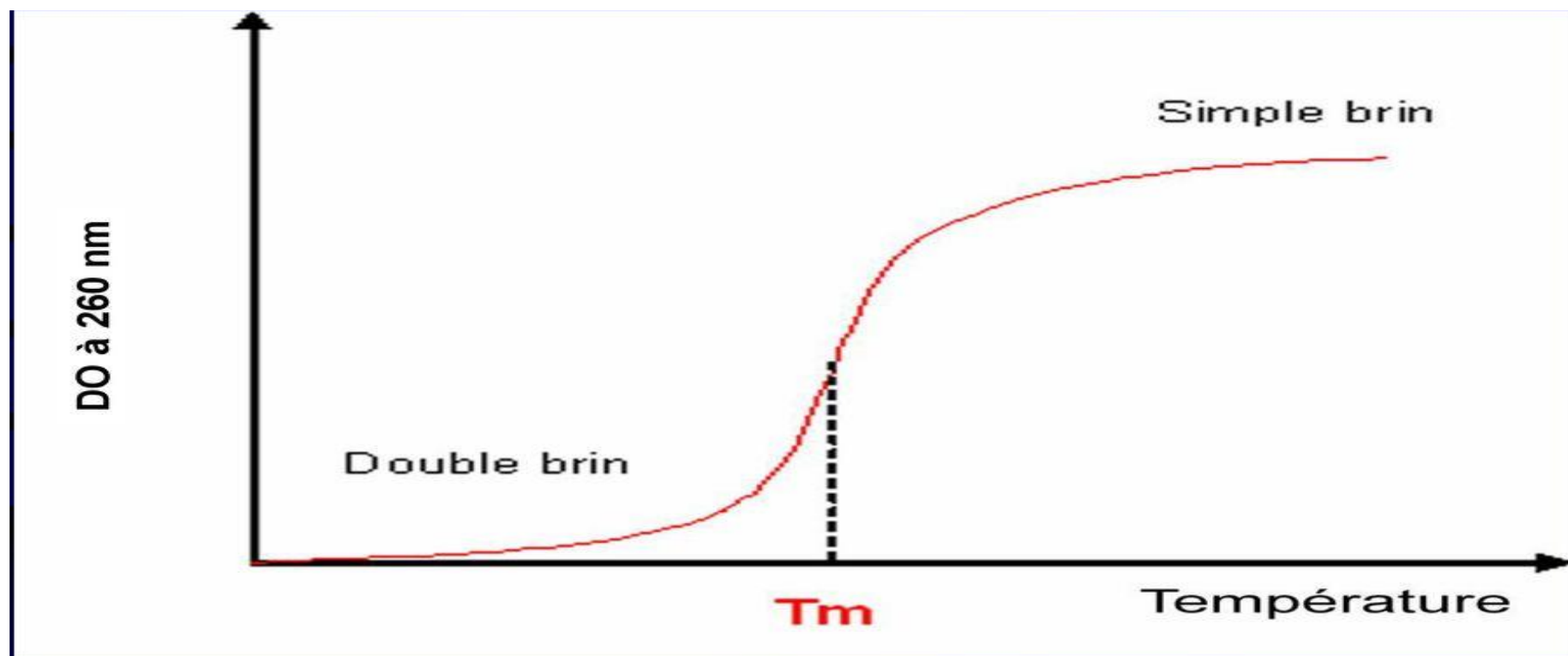
Utilisation de substances qui brisent les liaisons hydrogène :

NaOH (hydroxyde de sodium)

Urée, formamide, ou DMSO (diméthylsulfoxyde)

Température de fusion (T_m)

- La T_m est la température à laquelle 50 % de l'ADN est dénaturé.
- Elle dépend de :
 - ❖ La longueur du fragment
 - ❖ Le % de bases G-C (plus il est élevé, plus la T_m est haute)
 - ❖ La concentration en sel (le sel stabilise la double hélice)



Calcul de la Tm

- Oligonucléotide inférieur à 20 nt

- $(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4 = T_m \text{ en } ^\circ\text{C}$

- Oligonucléotide supérieur à 20 nt

- $[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] \times (1 + [(N-20)/20]) = T_m \text{ en } ^\circ\text{C}$

Elle reflète la stabilité de la liaison entre deux brins complémentaires.
Plus la Tm est élevée, plus l'appariement est stable.

- *Préparation de la sonde*

- Synthèse d'une sonde complémentaire de la séquence recherchée
- Marquage (radioactif, fluorescent, biotine, digoxigénine...)

- Hybridation

Mise en présence de la sonde avec la cible en conditions contrôlées

- Température proche de la température de fusion (T_m)
- Concentration en sel adaptée (stabilise les appariements)
- Durée suffisante pour permettre l'appariement

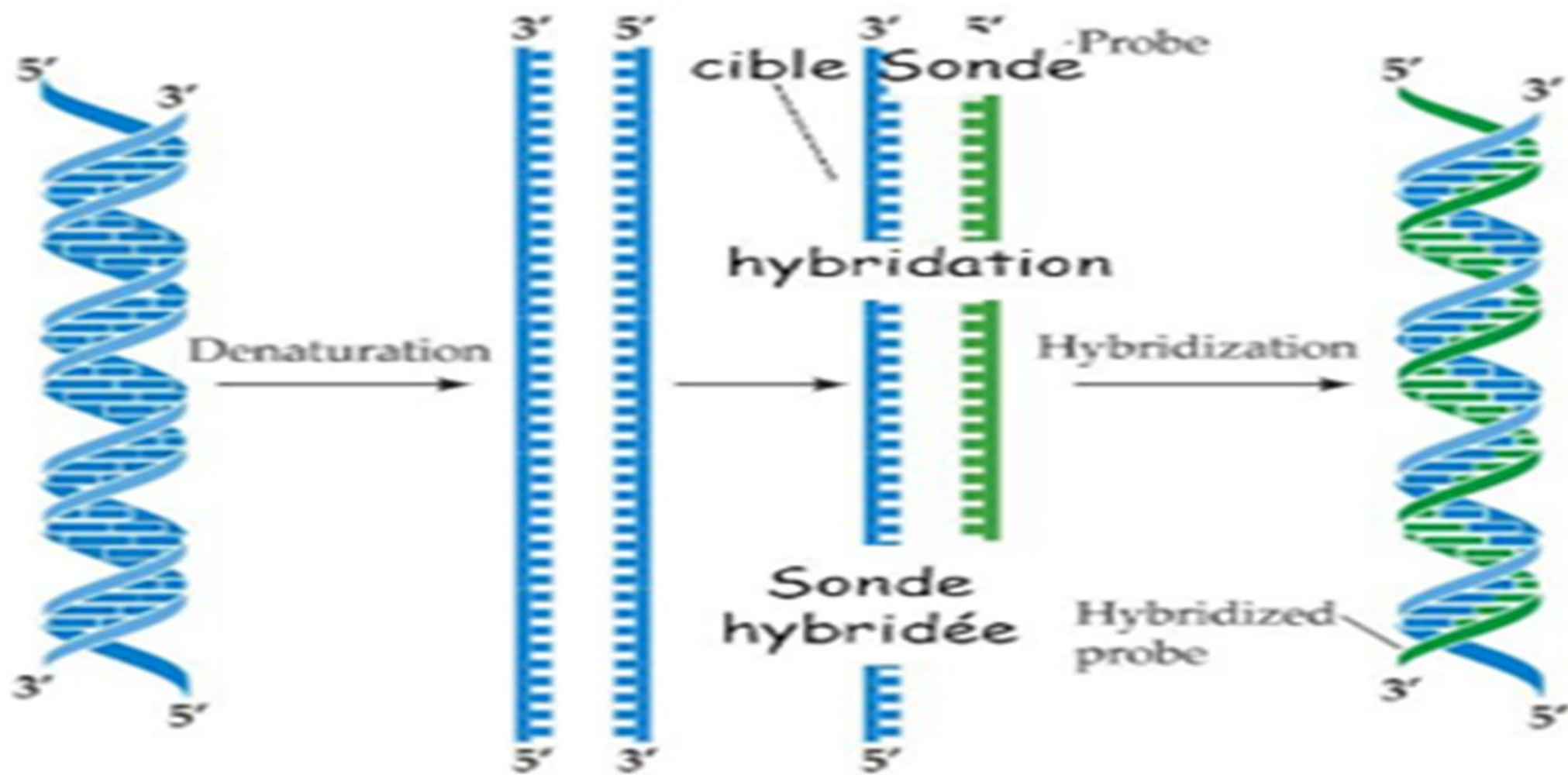
Lavages

- Élimination des sondes non spécifiques
- Conditions de lavage adaptées pour ne conserver que les appariements stables

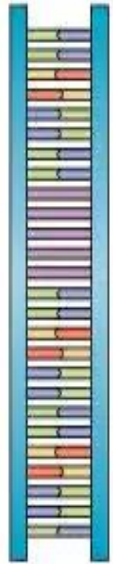
Détection du signal

- Selon le type de marquage :
- Radioactif → autoradiographie
- Fluorescent → microscope ou scanner laser
- Enzymatique (biotine ou digoxigénine) → réaction colorée ou chimioluminescente

RESEARCH METHOD



Séquence ADN

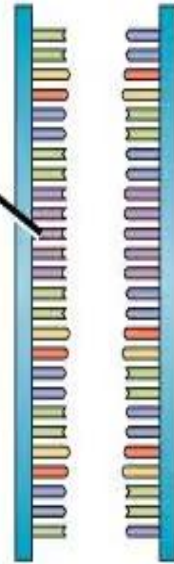


1

La séquence ADN
est isolée

Dénaturation

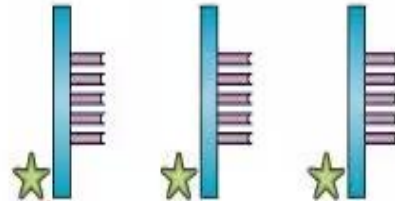
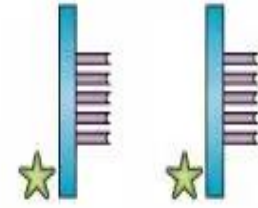
Gène
d'intérêt



2

L'ADN est dénaturé et apparié
avec une sonde nucléotidique
complémentaire marquée.

Sondes nucléotidiques



Marqueur moléculaire

+



3

La sonde se lie
à la séquence ADN
recherchée

Les applications de l'hybridation moléculaire

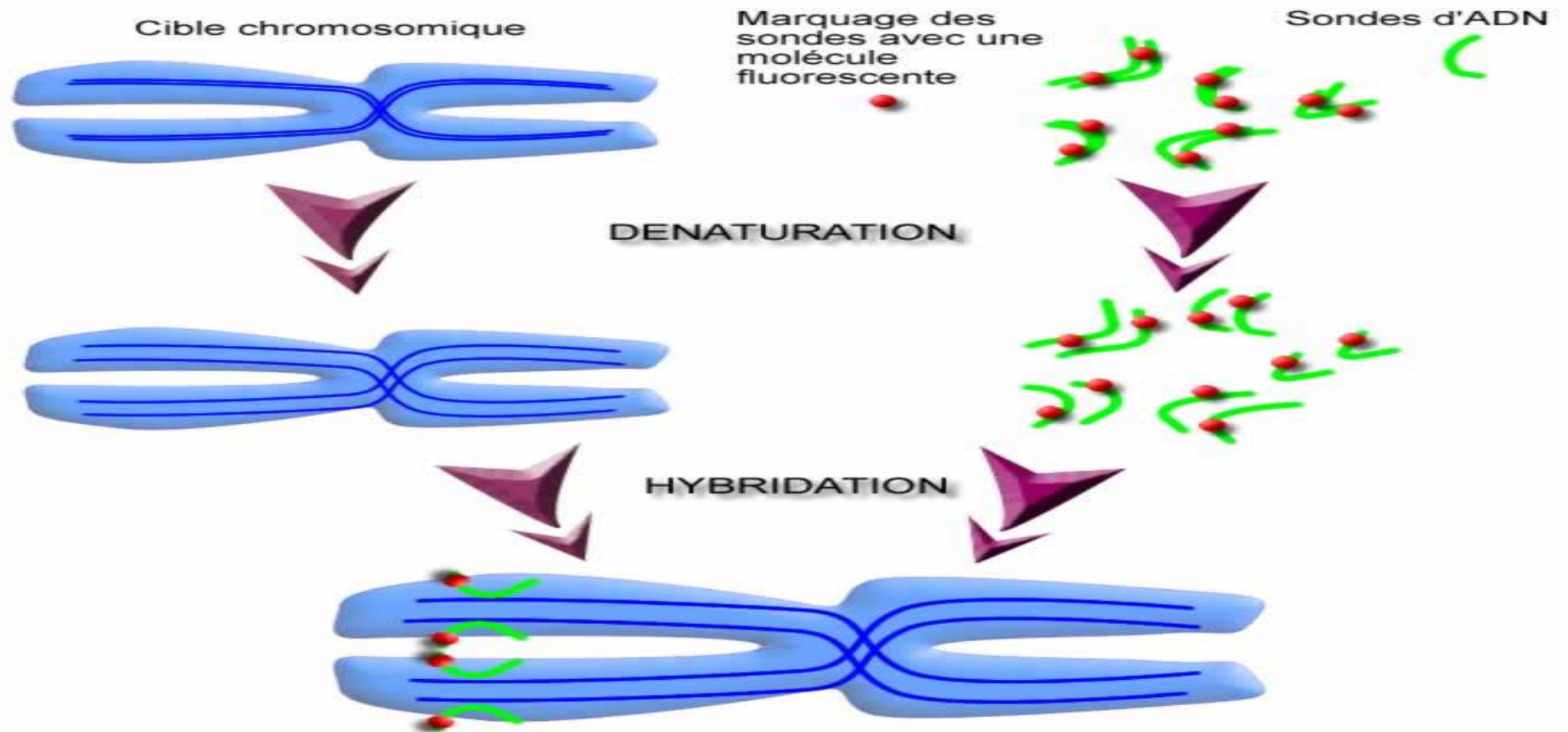
A. Détection de gènes ou mutations

- ***Southern blot*** : détection de séquences d'AND
- ***Northern blot*** : détection de l'ARNm
(niveau d'expression d'un gène)

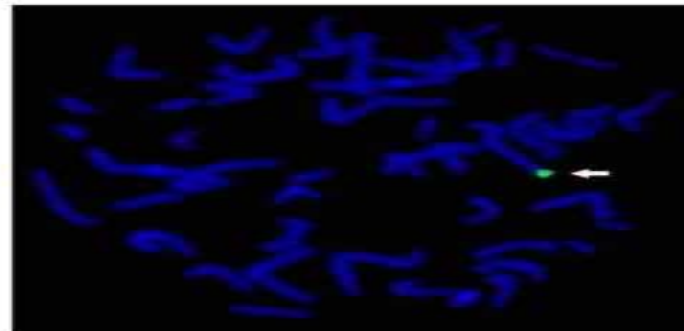
B. Hybridation in situ (FISH)

Utilisation de sondes fluorescentes pour localiser une séquence directement dans les cellules ou chromosomes.

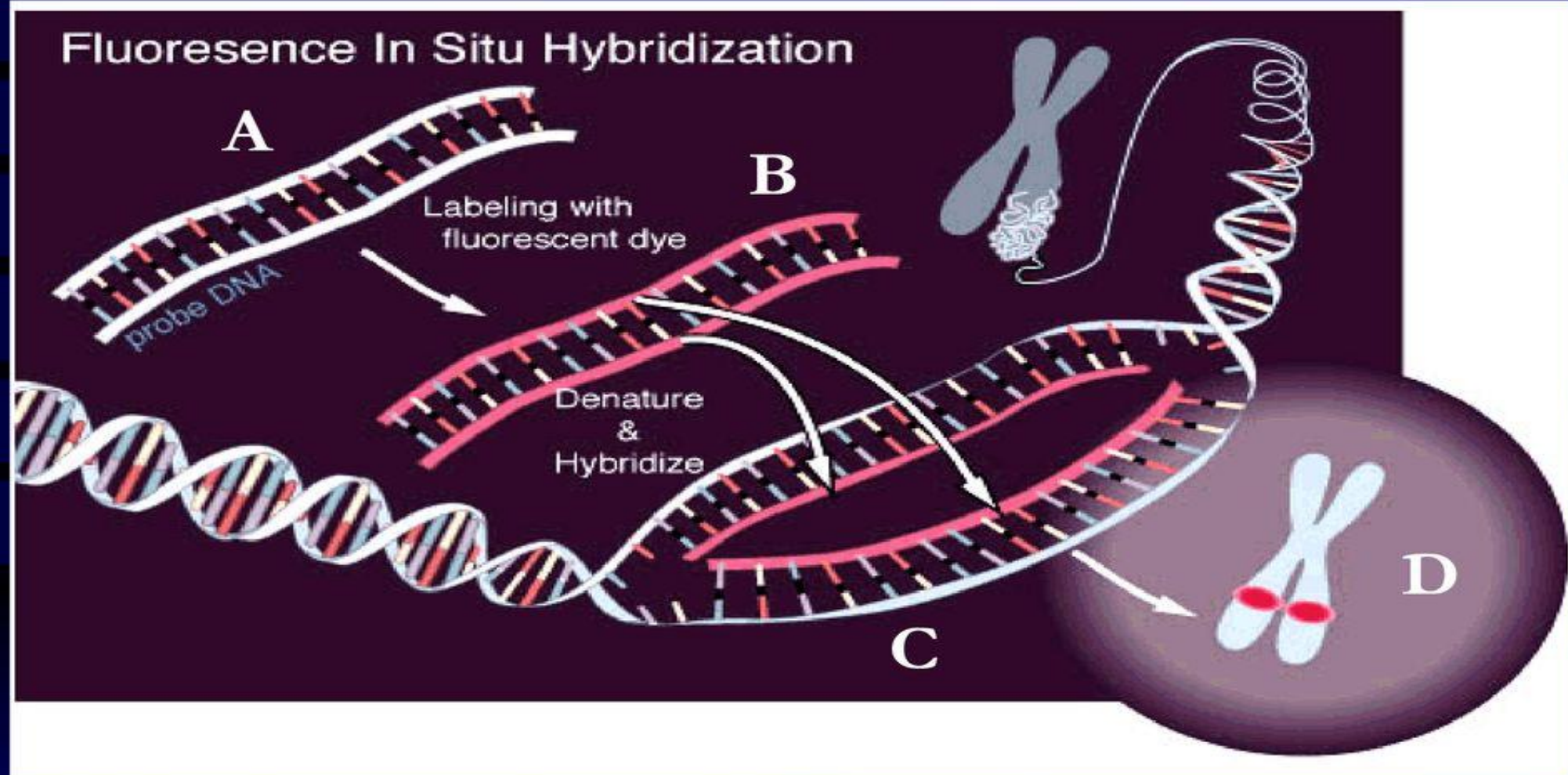
FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION



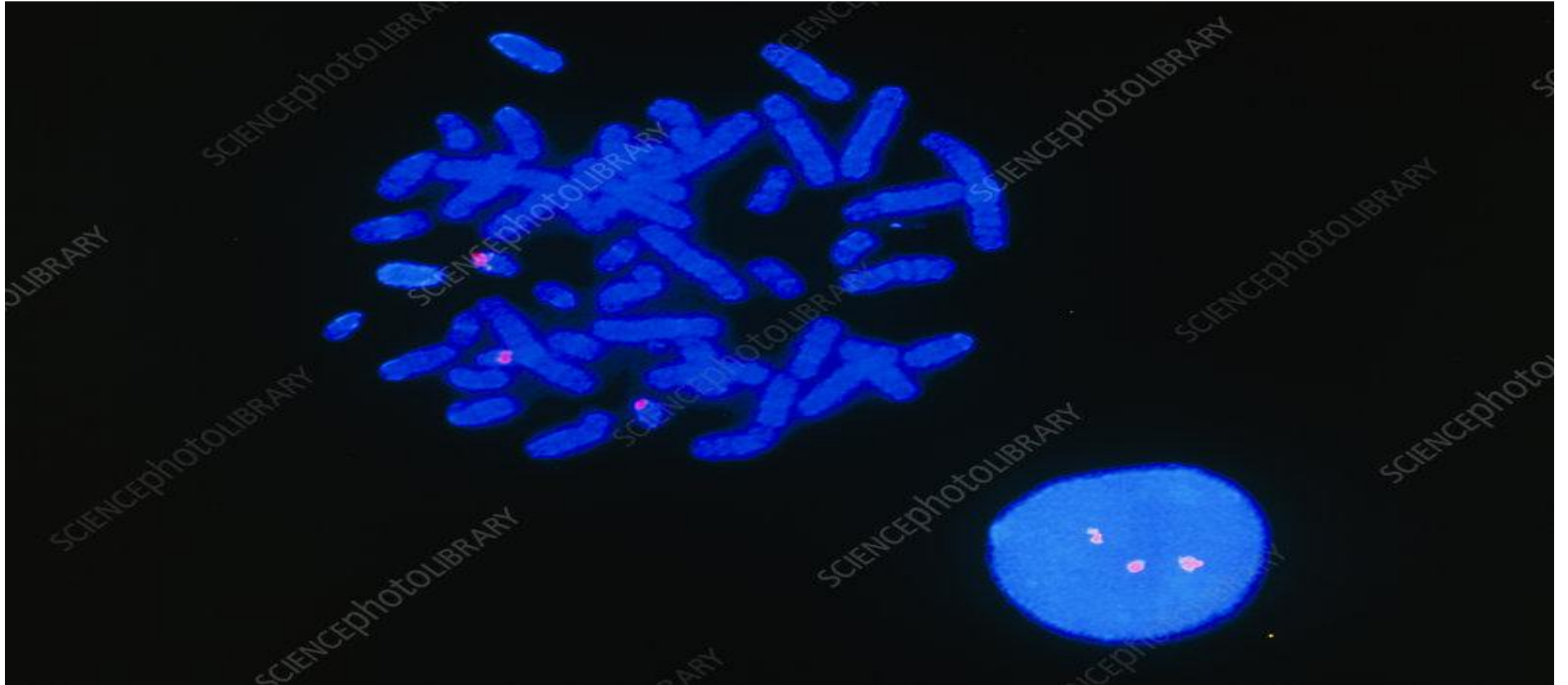
Dans l'image ci-contre, la sonde correspond à la partie q terminale du chromosome 4. Dans ce cas on peut diagnostiquer une délétion de la partie q terminale du chromosome 4



Hybridation *in situ* sur chromosome



Technique de l'hybridation fluorescente *in situ*. En **A** : sonde. **B** : sonde colorée à l'aide d'un **fluorochrome**. **C** : hybridation avec l'ADN nucléaire. **D** : apparence du chromosome métaphasique où la sonde s'est fixée.



FISH micrograph of chromosomes in Down's Syndrome

Application

Exemple

Cytogénétique

Détection d'anomalies chromosomiques
(trisomie 21, translocations)

Diagnostic prénatal

Recherche de microdélétions

|

Recherche en cancérologie

Amplification de HER2 dans le cancer du
sein

Localisation génique

Identifier la position d'un gène dans un
chromosome

C. Microarrays (puces à ADN)

Des milliers de sondes sont fixées sur une lame. L'échantillon d'ARN/ADN cible est marqué et hybridé sur la puce.

- ***Comparer l'expression des gènes*** entre cellules normales et tumorales
- ***Typage viral/bactérien*** : Identifier une souche infectieuse
- **Diagnostic génétique**: Identifier les mutations ou profils génétiques

- D. La PCR
- E. Diagnostic médical et génétique

Détection de virus	VIH, VHB, papillomavirus (par hybridation ADN-ARN viral)
Maladies génétiques	Thalassémie, mucoviscidose (dépistage de mutations)
Prénatal / Foetal	FISH sur amniocytes (trisomies, anomalies structurales)
Neurologie	Étude de l'expression de gènes dans les tissus cérébraux

- F. Recherche fondamentale
- G. Autres domaines
 - Microbiologie: Identification de bactéries ou champignons
 - Médecine légale :Identification d'ADN humain sur traces biologiques

Merci
pour
votre attention