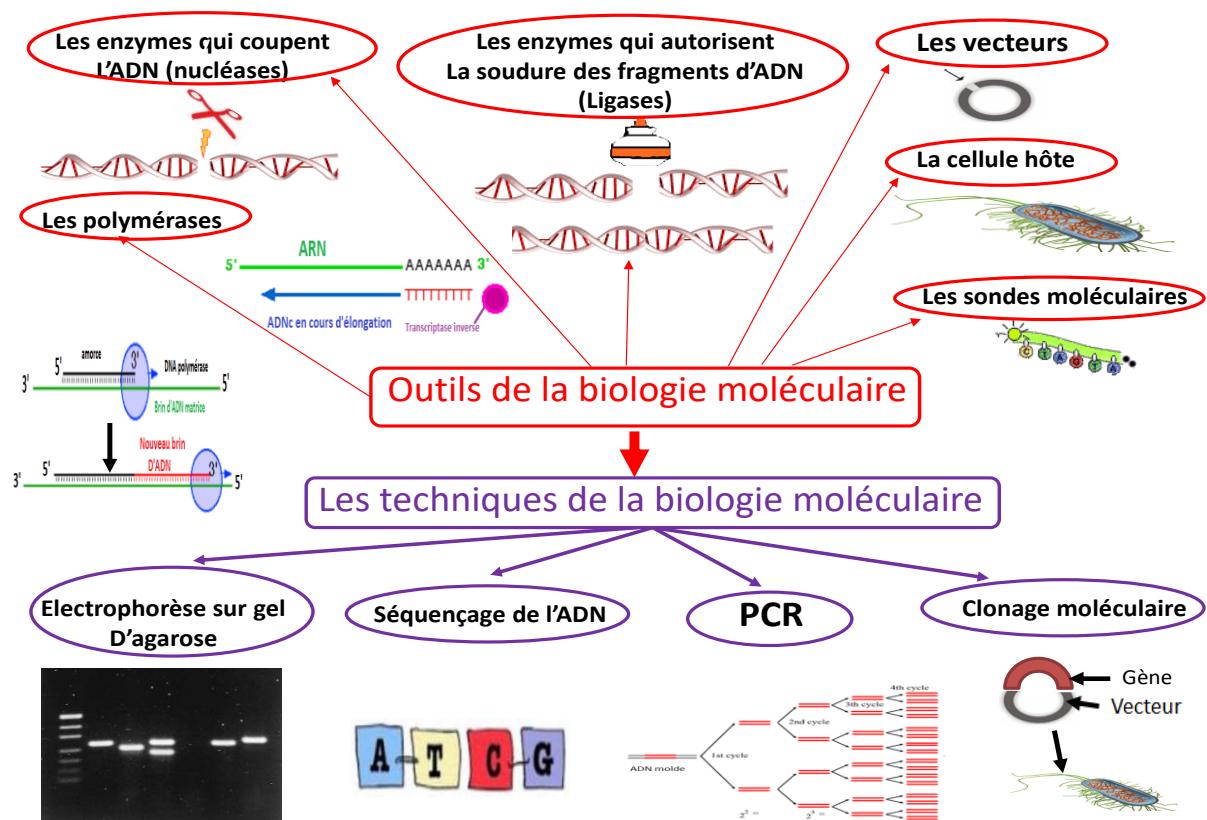


Les outils de la biologie moléculaire - II

I- Introduction :

Les outils de la biologie moléculaire sont utilisés par les techniques de la biologie moléculaire.

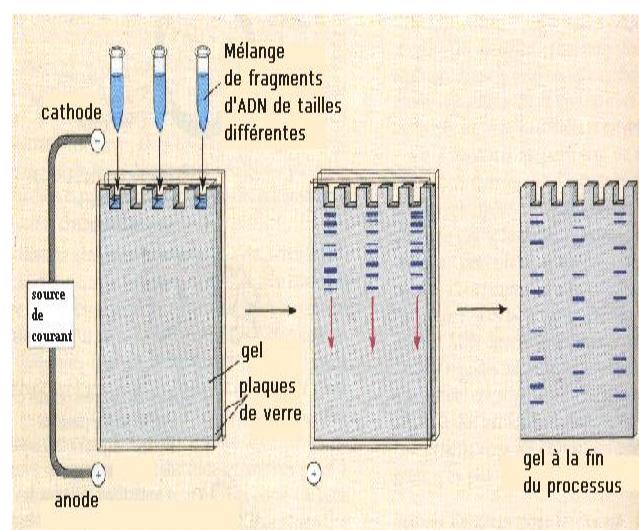


II- La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose :

Le but : séparer et identifier des fragments d'ADN et déterminer leur taille.

Le principe : l'ADN à étudier est déposé dans un tube ou on rajoute des enzymes de restriction.

Ensuite le produit de la digestion est déposé sur le **gel d'agarose avec un colorant**, sous l'effet d'un **champ électrique** les différents **fragments d'ADN migrent** à des vitesses différentes selon leurs **poids moléculaires**. Ils sont facilement **détectés** sur le gel grâce à un colorant.



III- La technique de PCR (réaction de polymérase en chaîne) : c'est une technique d'amplification de courtes séquences d'ADN in vitro, ces séquences sont appelées séquences d'intérêt. Cette technique est automatisée assurée par la machine PCR appelée aussi thermocycleur. La préparation de la séquence d'ADN à une amplification PCR nécessite premièrement l'extraction d'ADN et deuxièmement la préparation du tube PCR qui doit contenir : le fragment d'ADN à amplifier, l'ADN polymérase, les 04 désoxyribonucléotides et des amores.

Le but : obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

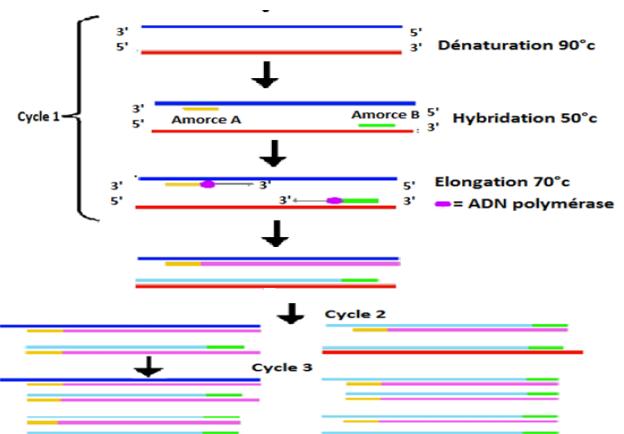
Le principe : l'amplification assurée par le thermocycleur est basée sur la répétition plusieurs fois d'un cycle qui se déroule en trois étapes :

- **Dénaturation** : les deux brins se séparent à la chaleur (**90°C**).

- **Hybridation** : l'amorce s'hybride spécifiquement aux extrémités de la séquence cible à amplifier grâce à la baisse de la température (**50°C**).

- **Elongation** : l'amorce est allongée par complémentarité au brin matrice, grâce à l'enzyme Taq polymérase qui est active à **70°C**.

Thermocycleur

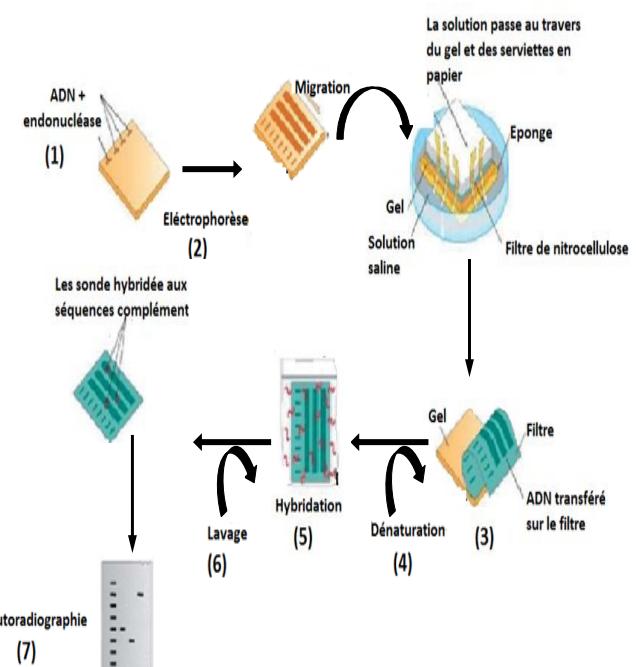


IV- La technique de Southern blot

Le but : c'est le transfert de l'ADN du gel sur une feuille de nitrocellulose ou de nylon afin de **visualiser des séquences précises** par **hybridation moléculaire** avec **une sonde marquée**.

Le principe :

1. Fragmentation de l'ADN par une endonucléase.
2. Séparation des fragments en fonction du poids moléculaire (électrophorèse sur gel d'agarose).
3. Transfert des fragments du gel sur une feuille de nitrocellulose.
4. Dénaturation de l'ADN fixé sur la feuille de nitrocellulose.
5. Mise en contact de l'ADN avec des sondes marquées en milieu liquide et sous agitation.
6. Lavage de la feuille pour éliminer les hybridations non spécifiques.



7 Visualisation des sondes fixées par autoradiographie.

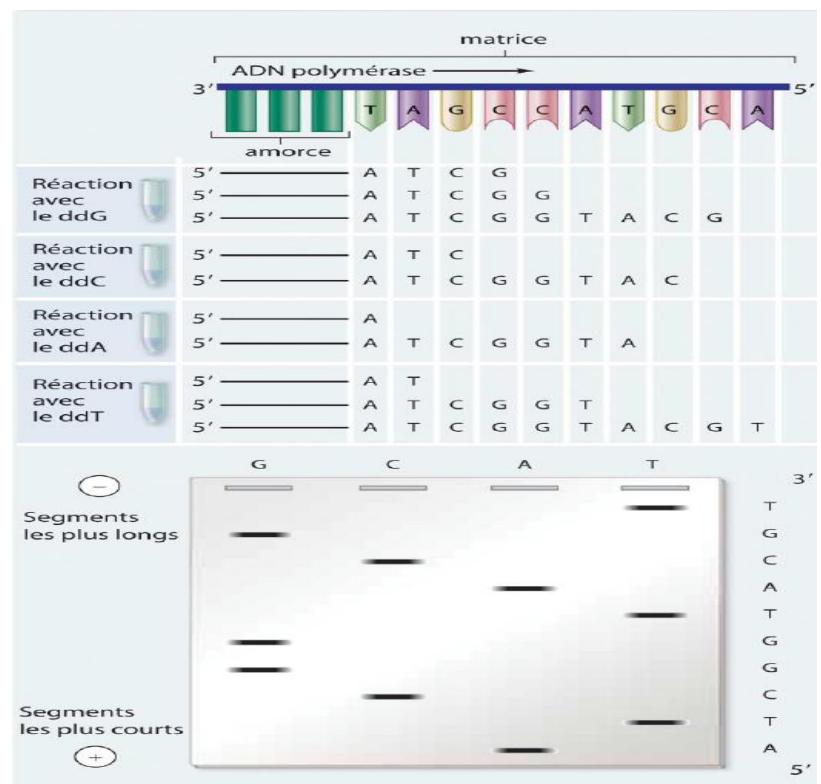
V- Les techniques de séquençage :

1- Technique de séquençage-Sanger :

Le but : c'est de déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN matrice, par la synthèse de son brin complémentaire.

Le principe : quatre différentes réactions de séquençage sont effectuées :

- Dans chaque éprouvette (tube) : on met l'ADN dénaturé (un seul brin) à séquencer en quantité suffisante, des amorces marquées à la radioactivité, L'ADN polymérase, les désoxynucléotides et un des quatre nucléotides modifiés les didésoxynucléotides (dd ATP, ddCTP, ddGTP, et ddTTP) qui, une fois incorporé, constitue la fin d'une chaîne d'ADN, ce qui permet d'identifier la base finale.



2- Le séquençage automatisé : assuré par le séquenceur automatique d'ADN.

- Le principe reste le même, les ddNTP sont marqués avec un fluorochrome, chaque fluochrome émet une couleur de longueur d'onde différente de celle des autres.

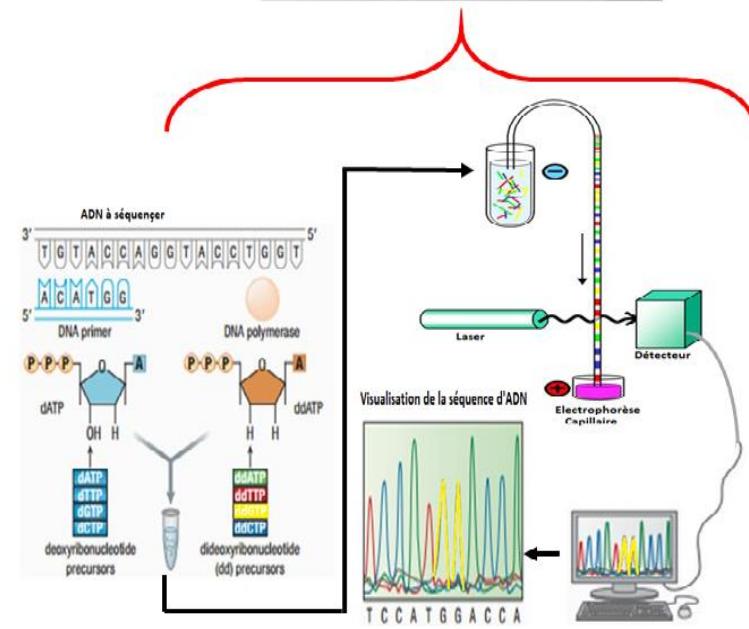
- On met dans un seul tube l'ADN matrice en quantité suffisante, les amorces, les dNTP, la polymérase et dans le même tube les quatre ddNTP marqués.

- Le tube est soumis à électrophorèse capillaire. Au bout du gel un détecteur équipé de 4 capteurs (un par longueur d'onde différente) enregistre la lumière émise par les molécules terminées par un ddNTP excité par le laser.

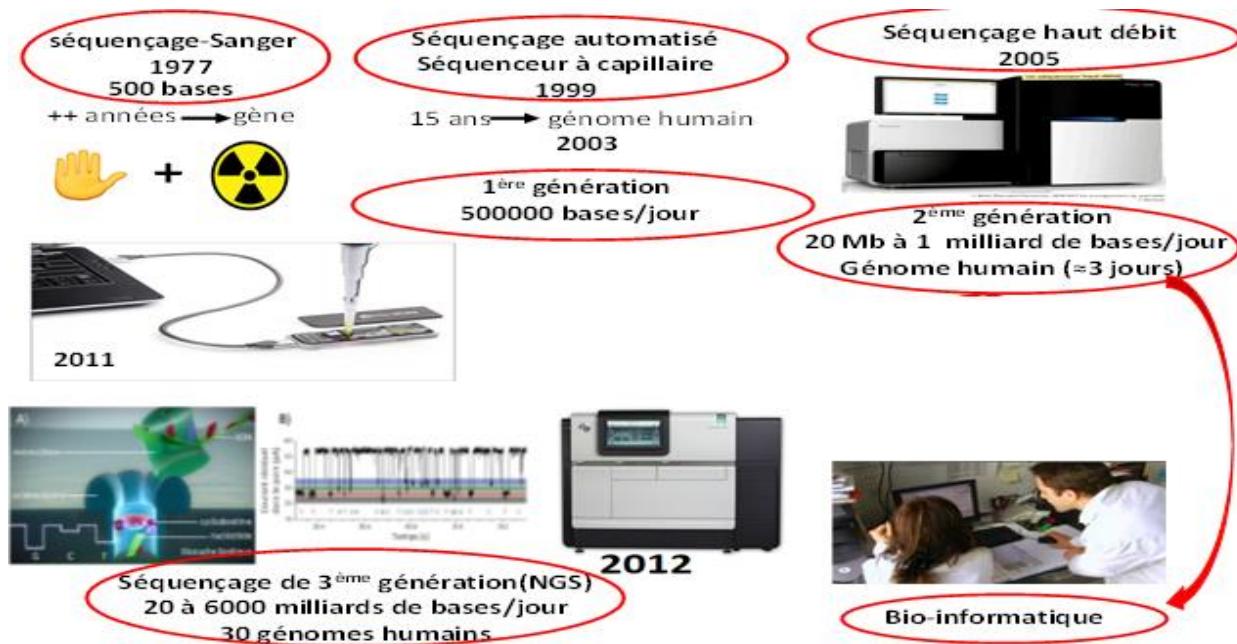
- Les signaux captés par le détecteur sont transmis à l'ordinateur et lus par un logiciel sous forme de pic (courbes) alternés de couleur différente, représentant la position des nucléotides dans la séquence d'ADN.

- Les graphes (courbes) sont interprétés en séquence nucléotidique affichée sous les courbes.

Séquenceur automatique de l'ADN



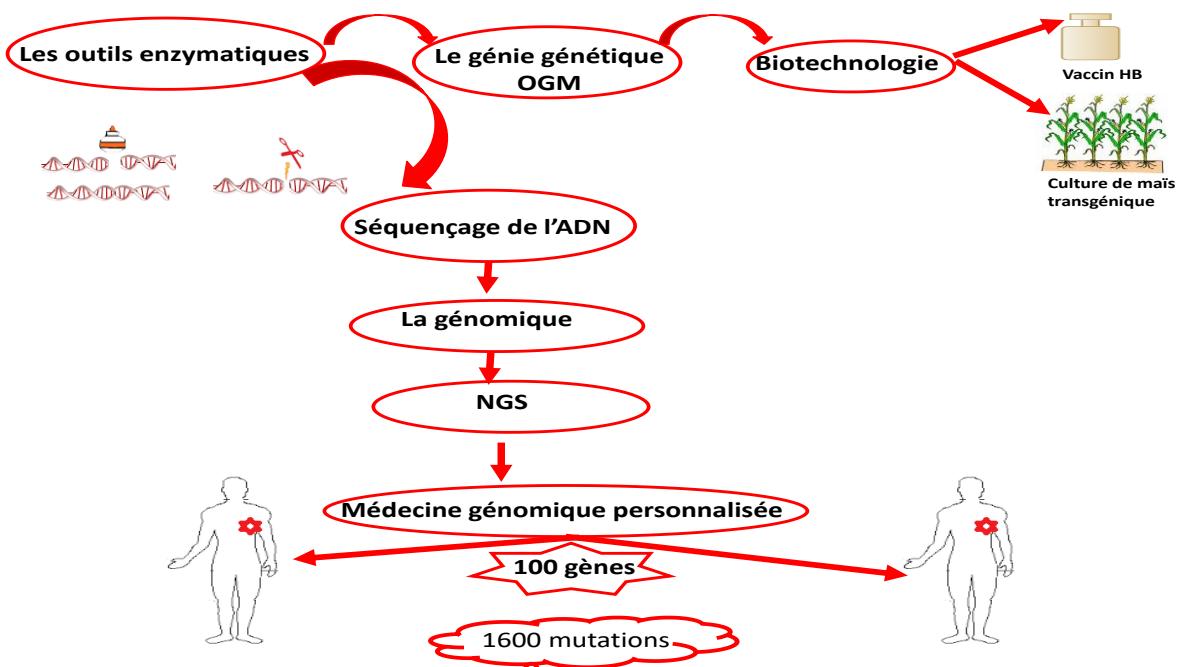
Les techniques de séquençage de l'ADN se sont considérablement développées :



Les séquenceurs de 3^{ème} génération à nanopore, comprennent des protéines transmembranaires possédant des pores insérés dans une bicouche phospholipidique, le nanopore est traversé par un courant électrique permettant de faire une lecture directe de la séquence d'ADN.

Conclusion :

La découverte des outils enzymatiques en biologie moléculaire et leur large utilisation est à l'origine de la naissance de plusieurs disciplines tel que le génie génétique et la biotechnologie utilisée dans le domaine de la santé et l'agroalimentaire.



Bibliographie:

1. Ansorge W, Voss H, Wirkner U, et al. Automated Sanger DNA sequencing with one label in less than four lanes on gel. *J Biochem Biophys Methods.* 1989;20(1):47-52. doi:10.1016/0165-022x(89)90080-8
2. Griffiths, Anthony.J.F.Miller, Jefferey. H. SUZUKI, DAVIDT. 3éd. Introduction à l'analyse génétique. Paris: de boeck; 2002,
3. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 2001;11(1):3-11. doi:10.1101/gr.11.1.3
4. Strachan, T., Read, A.P .: Human Molecular Genetics. 2 e éd. Bios Scientific Publishers, Oxford, 1999.
5. Wilson, R.K., et al.: Développement d'une procédure automatisée pour le séquençage d'ADN fluorescent. *Genomics* 6: 626-636, 1990