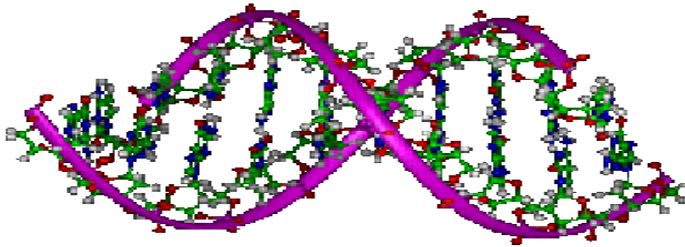


LES OUTILS ET TECHNIQUES EN BIOLOGIE **MOLECULAIRE**



DR BOUKROUS H

I/ GENERALITES :

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**.

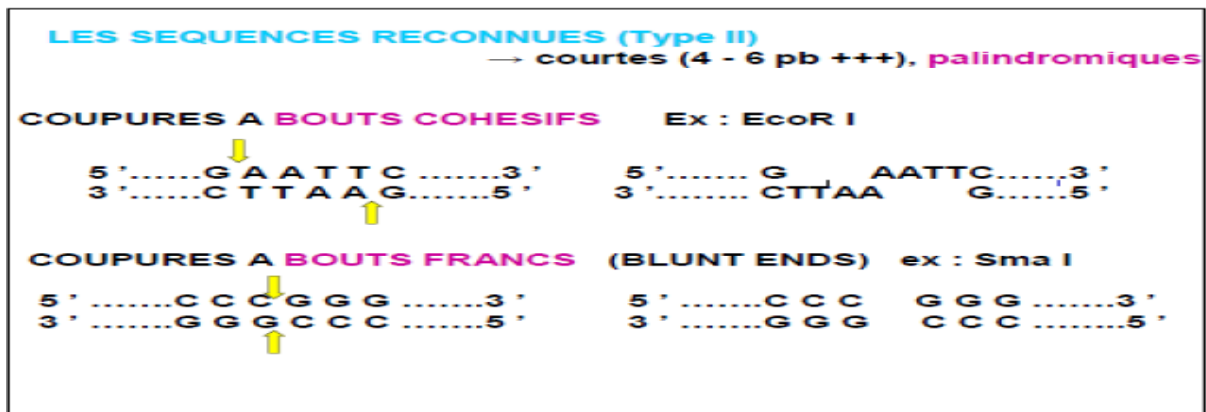
II/ OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE :

A/ ENZYMES DE RESTRICTION :

Découvertes à partir de 1973. **Les enzymes de restriction** sont capables de reconnaître spécifiquement une courte séquence, de 4 à 10pb, et de cliver l'ADN au site reconnu. Ils permettent de fragmenter l'ADN en segments de taille réduite, ou de le couper à tel ou tel site désiré.

Certains enzymes coupent le site en son milieu et produisent deux fragments dont les extrémités sont franches.

Cependant, la plupart réalisent une coupure dissymétrique : on parle dans ce cas d'extrémités **cohésives** (chaque fragment possède une chaîne qui dépasse l'autre de quelques bases).



Les enzymes de restriction sont utilisés pour **établir une carte de restriction** de toute **molécule d'ADN** que l'on souhaite caractériser.

Cela consiste à déterminer l'ordre des sites de restriction le long de cette molécule, qui vont produire, après "digestion enzymatique" de cette molécule, des fragments de tailles différentes dont la taille pourra être définie par **électrophorèse**

Les enzymes de restriction appartiennent à la classe des **endonucléases**, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver les **liaisons phosphodiester** entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique.

1/ Séquence D'ADN reconnue par l'enzyme de restriction :

Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des **séquences dites palindromiques**.

Les séquences palindromiques sont des séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5' à 3' (gauche-droite) pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens droite-gauche pour le second brin (sens 5' à 3').

Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4, 5 ou 6 paires de bases



2/ ORIGINES DES ENZYMES DE RESTRICTION :

Les enzymes de restriction sont extraites de micro-organismes, le plus souvent des bactéries.

Pour éviter une autodestruction de leur propre ADN, elles se protègent contre leurs propres enzymes de restriction par une modification des sites de restriction correspondants.

Ces enzymes de modification sont des méthylases bactériennes (ou enzymes de méthylation).

La méthylation de la cytosine (sur le carbone 5) ou de l'adénine (sur l'azote 6) appartenant à des sites de restriction aboutit à une inactivation de l'enzyme de restriction correspondante.

Cette méthylation peut se réaliser sur une base ou sur plusieurs bases appartenant au site de restriction. Les méthylases bactériennes sont très spécifiques.

Eco RI

E : genre *Escherichia*

Co : espèce *Coli*

R : variété

I : Numéro d'ordre (s'il y a plusieurs enzymes)

3 / NOMENCLATURE DES ENZYMES DE RESTRICTION :

Les enzymes de restriction présentent une nomenclature bien précise.

Leur nom comporte plusieurs lettres (3 ou 4).

La première lettre de dénomination de l'enzyme est écrite en majuscule, elle correspond au genre de la bactérie d'où a été extraite l'enzyme.

La seconde lettre et la troisième lettre (en minuscules) correspondent à l'espèce de la bactérie d'où l'enzyme est extraite.

On peut avoir une quatrième lettre écrite en majuscule correspondant à la souche bactérienne.

Enfin pour terminer, un chiffre romain indique l'ordre de caractérisation de ces enzymes.

Exemples:

Eco RI Extraite de *Escherichia coli* RYB site reconnu: G / AATTC

Sma I Extraite de *Serratia marcescens* site reconnu: CGC / GGG

Pst I Extraite de *Providencia stuartii* site reconnu: CTGCA / G

NOTION D'ISOSCHISOMERE

Des enzymes de restriction différentes peuvent reconnaître des mêmes sites spécifiques, on les appelle **isoschizomères**.

Les isoschizomères fournissent souvent après clivage enzymatique des fragments dont les extrémités sont différentes.

Exemple

Soit la séquence suivante: **GGTACC**, cette séquence est coupée par l'enzyme SKpn I et l'enzyme Acc65 I

- SKpn I:

5'-G-G-T-A-C/C-3'

3'-C/ C-A-T-G-G-5'

- Acc65 I:

5'-G/G-T-A-C-C-3'

3'-C-C-A-T-G/G-5'

4 / CLASSE DES ENZYMES DE RESTRICTION

La plupart des enzymes de restriction utilisées au laboratoire présentent un site de reconnaissance (souvent palindromique) et un site de coupure identique ou proche du site de reconnaissance, ce sont des **enzymes de type II**. (coupent une vingtaine de nucléotide plus loin)

Certaines bactéries possèdent d'autres types d'enzymes de restriction. Les **enzymes de type I** reconnaissent des séquences sur l'ADN sans aucune symétrie. Ces enzymes coupent non pas au niveau de la séquence de reconnaissance mais 1000 à 5000 paires de bases plus loin.

5/ utilisation des enzymes de restriction :

Les utilisations des enzymes de restriction sont très nombreuses en biologie moléculaire :

- ✱ Par exemple, elles permettent de fractionner l'ADN en multiples fragments susceptibles d'être séparés par les techniques d'électrophorèse.
- ✱ Les enzymes de restriction peuvent être utilisées pour préparer un fragment d'ADN d'un gène donné (insert) à être inséré dans un vecteur comme un plasmide.
- ✱ Les enzymes de restriction sont utilisées couramment pour rechercher des mutations dans le génome
- ✱ Les enzymes de restriction sont utilisées pour rechercher dans l'ADN des cellules eucaryotes les méthylations de bases. Ces méthylations ont une signification complètement différente des méthylations de bases observées chez les procaryotes. Elles sont en relation directe avec des modifications de l'expression des gènes des eucaryotes.
La méthylation provoque le verrouillage de l'expression de tel ou tel gène dans un tissu. Les méthylations dans le génome des eucaryotes concernent les cytosines impliquées dans les doublets dinucléotidiques CG.

B/ LES OUTILS ENZYMATIQUE AUTRES QUE LES ENZYMES DE RESTRICTION :

1/LES ENZYMES COUPANT L'ADN : LA DNASE

La DNase utilisée au laboratoire est extraite du pancréas de bovin. Il s'agit d'une **endonucléase** qui coupe l'ADN double brin (mais aussi l'ADN simple brin).

Elle conduit à des coupures ou " nicks " tout à fait au hasard, sans reconnaissance d'un site spécifique (ce qui la distingue des enzymes de restriction). On obtient des fragments de tailles variées (ou oligonucléotides) qui possèdent en leur extrémité 5' un groupement phosphate.

Cette enzyme est sensible à des ions bivalents (Mg^{2+} et Mn^{2+}).

Elle est utilisée pour des marquages de sondes avec des radio-isotopes. La nucléase S1 : Cette enzyme extraite d'un champignon, n'attaque que l'ADN simple brin. Elle n'attaque pas en principe les ADN doubles brins et les hybrides ADN-ARN.

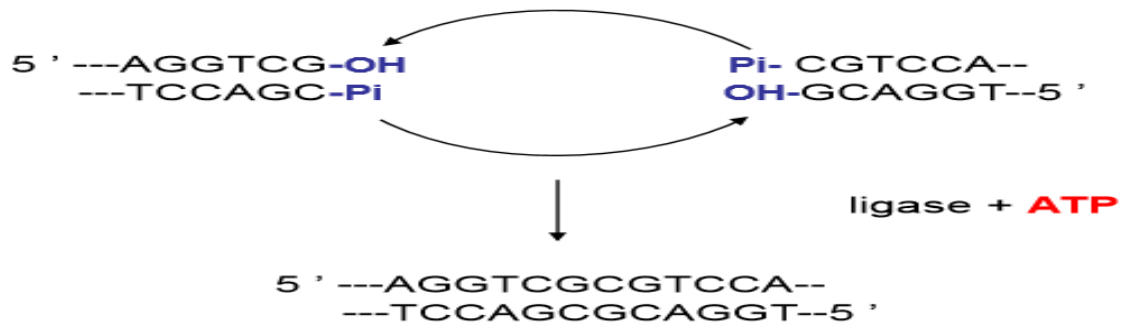
2/ LES ENZYMES ASSURANT LA LIGATURE : LES LIGASES

Les ligases sont capables de lier par une liaison ester un fragment avec un groupement phosphate en 5' et un groupement OH en 3' et ceci en présence d'ATP.

Elles peuvent effectuer des ligatures sur des fragments d'ADN avec bouts francs ou des bouts collants (ou extrémités cohésives).

Elles sont extraites de bactéries.

Il existe ADN et ARN ligases.



3/ LES ENZYMES ENLEVANT OU AJOUTANT DES GROUPES POSPHATES :

ENZYMES ENLEVANT DES GROUPES PHOSPHATES :

Ces enzymes sont appelées **phosphatases**. Les phosphatases alcalines sont actives à pH alcalin. Elles permettent d'enlever le groupement phosphate situé en 5' d'une chaîne d'ADN. Elles sont extraites de bactéries ou d'origine animale (intestins). Elles sont utilisées pour préparer de l'ADN recombinant.

ENZYMES AJOUTANT DES GROUPEMENTS PHOSPHATES :

Les **kinases** permettent de fixer un groupement phosphate en présence d'ATP. Dans cette molécule d'ATP, le phosphate fixé est celui situé en position gamma (position la plus externe) de la molécule d'ATP. Le groupement phosphate est fixé à l'extrémité 5' d'un ADN préalablement déphosphorylé. Ces kinases sont extraites de bactéries

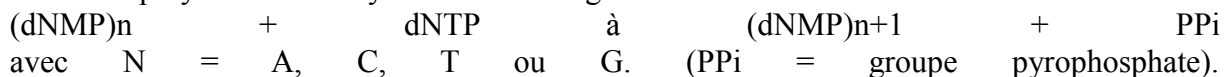
4 /LES ENZYMES RECOPIANT LES ACIDES NUCLÉIQUES :

Les enzymes recopiant aussi bien une chaîne d'ADN ou d'ARN ont les propriétés générales suivantes :

- Elles synthétisent le nouveau brin dans le sens 5'-3'.
- Cette synthèse s'effectue de manière complémentaire et antiparallèle.
- Elles nécessitent la présence de nucléosides triphosphates (NTPs) ou de désoxynucléosides triphosphates (dNTPs).

5 /LES ENZYMES RECOPIANT UN ADN EN ADN :

Ces enzymes sont des **ADN polymérases ADN dépendantes**. Elles ne sont pas capables de synthétiser le brin nouveau d'ADN sans la présence d'une amorce d'acide nucléique. Les ADN polymérases catalysent la réaction générale suivante :



Toutes les ADN polymérases possèdent les caractéristiques suivantes :

- Elles ont besoin d'une amorce avec une extrémité 3'-OH libre;
- La chaîne nouvelle d'ADN est synthétisée dans le sens 5' à 3';
- La chaîne nouvelle est complémentaire de la chaîne matrice d'ADN et antiparallèle.

- **Exemple 1 L'ADN polymérase I (extraite de E. Coli) et le fragment de Klenow**

Comme exemple-type d'ADN polymérase, nous citerons l'ADN polymérase I qui est extraite d'E. Coli. Cette enzyme possède des propriétés polymérasiques, mais aussi des propriétés exonucléasiques. Il est important de préciser que les exonucléases peuvent

couper les nucléotides un par un à partir d'une chaîne polynucléotidique avec une spécificité soit de l'extrémité 5' (coupure 5' à 3'), soit de l'extrémité 3' (coupure 3' à 5').

- L'ADN polymérase I possède les deux activités exonucléasiques: 5' à 3' et 3' à 5'. Cette enzyme est constituée par une seule chaîne polypeptidique.
Au laboratoire, on utilise souvent une enzyme préparée à partir de l'ADN polymérase I qui est appelée fragment de Klenow.
Cette enzyme ne possède plus d'activité exonucléasique 5' à 3', il reste les propriétés polymérasiques et les propriétés exonucléasiques 3' à 5'.
L'activité 3' à 5' permet à l'enzyme au cours d'une synthèse d'un fragment d'ADN de contrôler si l'appariement de la base qui vient d'être ajoutée est conforme aux règles de complémentarité. Cette remarquable activité exonucléasique 3' à 5' est encore appelée la fonction d'édition de l'enzyme.

Exemple 2 La Taq polymérase

La Taq polymérase est **une ADN polymérase** extraite de bactéries présentes **dans les sources chaudes**.

Elle permet de travailler avec des températures plus élevées que les températures usuelles (ambiante ou 37°C). Elle est très utilisée dans les **réactions d'amplification génique** et également dans les réactions **de séquençage de l'ADN**.

En principe, elle est dépourvue de l'activité exonucléasique 3' à 5'.

6/ Les enzymes recopiant un ARN en un ADN :

Exemple la rétrotranscriptase ou transcriptase inverse

Cette enzyme est surtout présente **dans les rétrovirus (virus à ARN)**. Elle permet de fabriquer à partir d'un ARN messager (mARN) un ADNc (ou séquence d'ADN complémentaire d'un mARN). Elle possède les propriétés suivantes:

- C'est une ADN polymérase qui synthétise le nouveau fragment dans le sens 5' à 3'.
- Elle est ARN-dépendante.
- Elle est dépourvue d'activité exonucléasique 3' à 5', donc de fonction d'édition. Elle peut donc insérer des bases par erreur.
- Elle a une activité RNase.

La technique classique pour préparer un ADNc à partir d'un mARN consiste tout d'abord à fournir une amorce à la rétrotranscriptase. Cette amorce peut être une séquence courte par exemple une séquence oligo(dT) capable de s'hybrider avec l'extrémité poly(A) du mARN.

A partir de cette amorce, la rétrotranscriptase poursuit la copie en ADN du mARN (élongation). De plus à la fin de la copie, elle est capable de recopier son propre travail, donc elle réalise **une boucle à l'extrémité 3' de l'ADN copié**.

Un traitement chimique doux permet de détruire le mARN simple brin mais pas sa copie d'ADN simple brin.

On ajoute ensuite de l'ADN polymérase pour réaliser une copie de l'ADN simple en ADN double brin.

La nucléase S1 peut ensuite éliminer l'extrémité de l'épingle à cheveu.

On a ainsi formé un ADNc double brin.

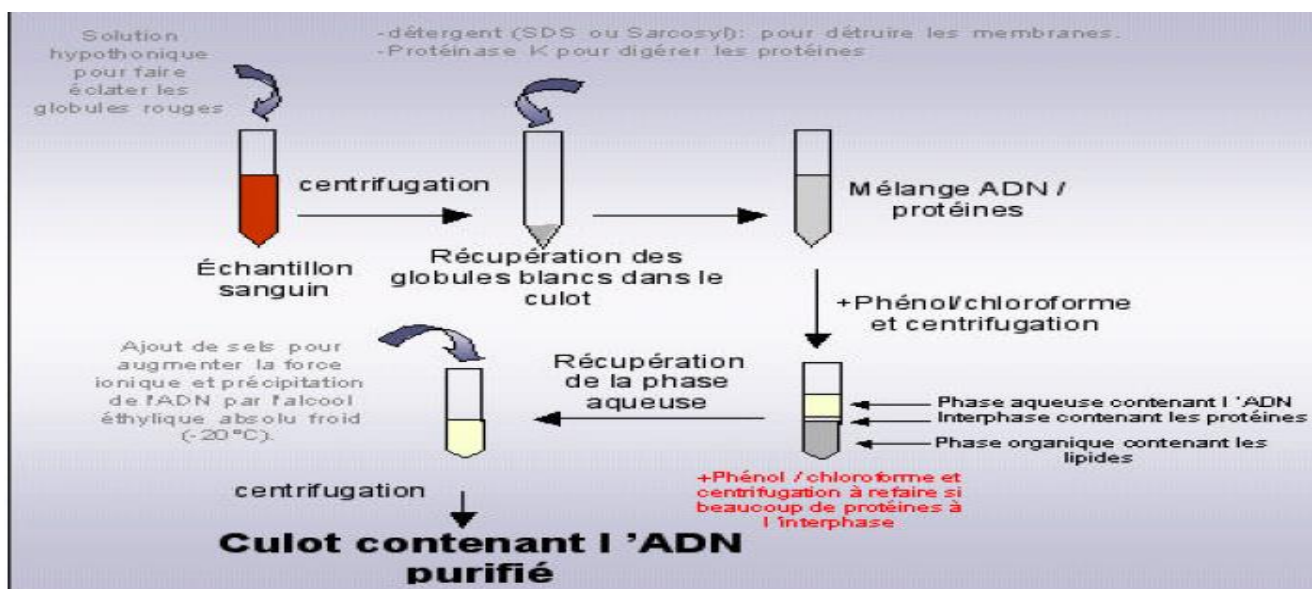
D'autres techniques existent pour préparer du ADNc à partir du Marn

7/ Les enzymes recopiant un ADN en un ARN

- Elles synthétisent le brin nouveau dans le sens 5' à 3'.
- Elles n'ont pas besoin d'amorce pour commencer la synthèse (à la différence des ADN polymérases).
- Elles nécessitent des ribonucléosides triphosphates (ou NTPs) et également comme les autres polymérases) des ions Mg^{2+} .
- Elles sont dénuées d'activité d'édition.
- Enfin, dans des conditions normales de transcription, les ARN polymérases ne peuvent démarrer la transcription que si l'ADN à transcrire possède le promoteur spécifique correspondant

III/ PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE :

A/ EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES :



EXTRACTION DU RNA

L'extraction des ARN est très différente de celle des ADN, car ils sont beaucoup plus fragiles (simple brin, —OH attaquable ...).

On utilise à peu près le même protocole qu'avec les acides nucléiques, sauf qu'il faut ajouter un inhibiteur des RNases, des **DNases** ainsi qu'un *agent réducteur*.

On obtient les **ARN totaux**. Pour séparer les **ARN polyA+** (ARNm des eucaryotes), on effectue une chromatographie d'affinité avec des polyT ou des polyU.

B /Estimation des quantités d'ADN :

Cette estimation est indispensable après extraction d'ADN à partir d'un matériel biologique.

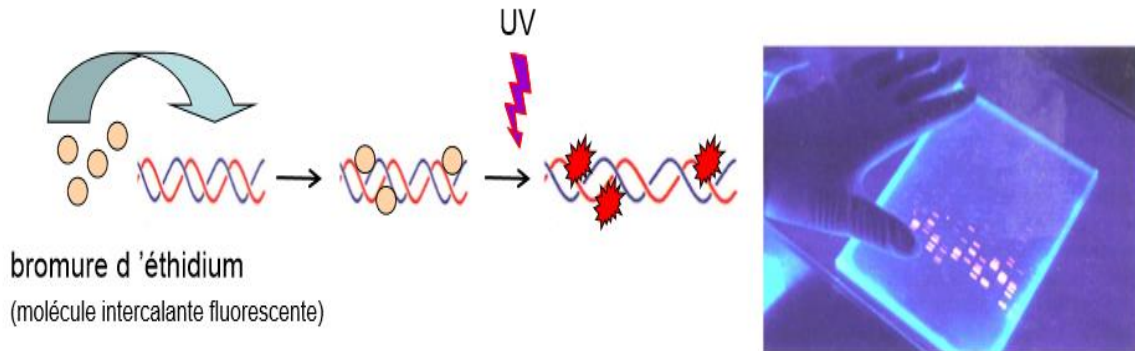
1/ Méthode basée sur la fluorescence.

Le principe est un fluorochrome qui se fixe sur le DNA et dont le taux de fixation est directement lié à la quantité de DNA émettra une quantité de fluorescence qui sera proportionnelle à la quantité de DNA présente.

Les différents fluorochromes:

- Se fixant spécifiquement sur des paires de bases
- Intercalants : Ils ont l'avantage d'être moins chers, Iodure de propidium, Bromure d'éthidium et Acridine orange.

- utilisation de molécules fluorescentes



2/ Méthode basée sur la spectrophotométrie.

Le dosage s'effectue par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 260 nm. Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260 nm. Une unité de densité optique correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50 µg/ml ou à l'absorption d'une solution d'ADN simple brin (ou d'ARN) à la concentration de 25 µg/ml.

C/Conservation de l'ADN

Le stockage des acides nucléiques se fait au froid:

- Pour un stockage à court terme, l'ADN est gardé à +4°C
- Pour un stockage à long terme, l'ADN est placé à -20°C

VI/ LES SONDÉS NUCLEOTIDIQUE :

- Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Cette réaction sonde-fragment correspond à *une réaction d'hybridation moléculaire*.
- Obtention d'une sonde : Il existe plusieurs possibilités pour obtenir une sonde nucléotidique :- Une sonde oligonucléotidique peut être fabriquée par synthèse chimique. Une sonde peut être un ADNc. Une partie seulement du ADNc .

- Une sonde peut être théoriquement du mARN.

- Caractéristiques générales

Une sonde nucléotidique peut être soit une séquence d'ADN ou d'ARN, mais *obligatoirement monobrin*.

Sa taille est très variable: oligonucléotide de 20-30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides.

La sonde est complémentaire et antiparallèle du fragment recherché.

Dans un mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage avec un radioisotope (marquage chaud), mais il existe également des sondes appelées sondes froides sans marquage par un radioisotope

V/ SEPARATION DES ACIDES NUCLEIQUES

<u>Ultracentrifugation</u>	<u>Chromatographie</u>	<u>Électrophorèse</u>
→ Gradient de saccharose (en fonction de la taille et du poids moléculaire) → Gradient de densité au CsCl (en fonction de la densité)	→ D'affinité → Filtration sur gel (sépare nucléotides libres) → Échanges d'ions (récupère petites quantités) → HPLC <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (sépare fragments d'ADN)	→ En champ pulsé → Préparative

L'**électrophorèse** est une technique très utilisée. Plus la molécule est grande, plus elle migre. La mobilité de la molécule dépend de sa concentration et du gel utilisé.

I/ MIGRATION ELECTROPHORETIQUE :

Les fragments d'ADN après digestion par les enzymes de restriction peuvent être séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose.

Dans ce type de gel, les migrations des fragments d'ADN dépendent **de la taille du fragment** plus que de la charge de celui-ci.

Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion sera importante.

A l'opposé les fragments de petite taille auront une distance de migration la plus élevée.

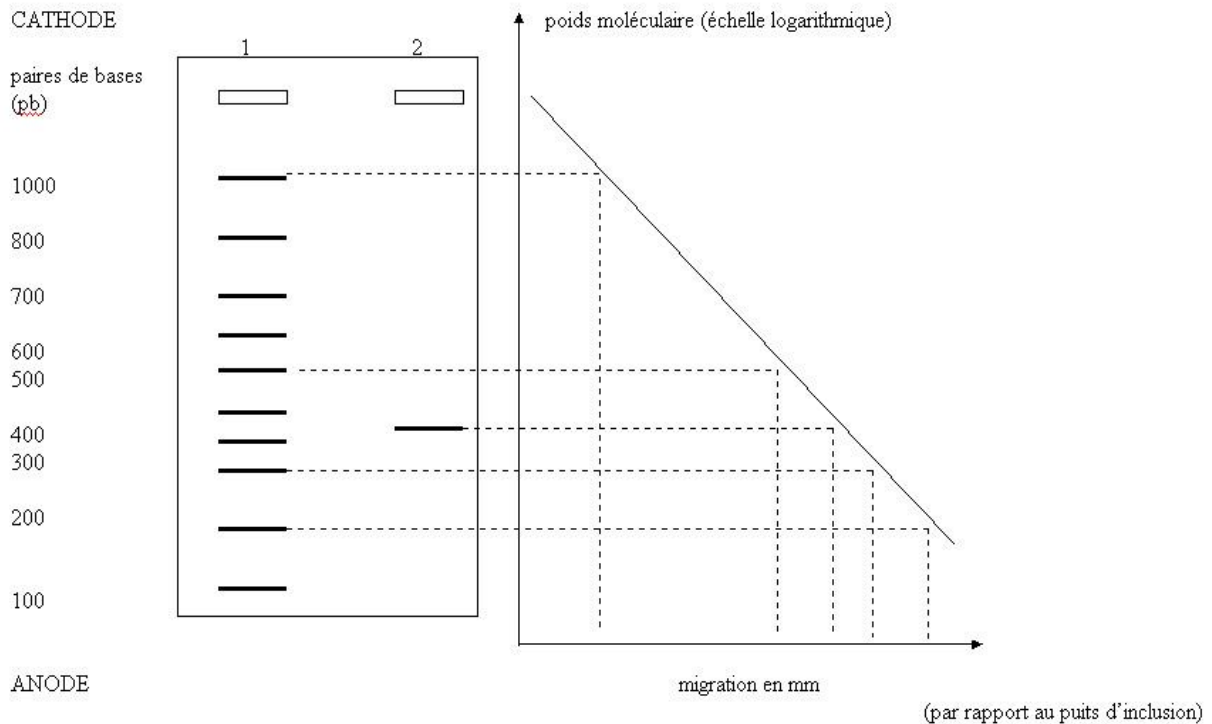
La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse est effectuée en faisant migrer **des marqueurs de poids** moléculaire en parallèle avec les échantillons à analyser.

La détection de l'ADN sur ce type de gel est réalisée **par exposition aux rayons UV** après réaction avec un réactif spécifique (bromure d'éthidium par exemple, agent s'intercalant entre les brins d'ADN).

L'électrophorèse des fragments d'ADN en gel d'agarose permet des séparations **jusqu'à 20-25 kb (20000-25000 pb)**.

Des fragments d'ADN de taille restreinte (inférieure à 1000 paires de bases) peuvent être séparés **par électrophorèse sur gel de polyacrylamide**.

D'autres techniques électrophorétiques existent comme l'électrophorèse en champ pulsé qui permet de séparer des grands fragments d'ADN (taille supérieure à 50 kb).



2/ ULTRACENTRIFUGATION :

La centrifugation est une technique de séparation rapide **des particules solides** (les plus lourdes) **des substances en solution** (moins lourdes).

Une suspension de macromolécules peut éventuellement laisser sédimenter celles-ci sous l'effet du champ de pesanteur

Pour rendre possible la séparation, il faut travailler avec de très grandes accélérations. Ceci est possible avec des centrifugeuses ou ultracentrifugeuses.

IV/ TECHNIQUES EN BIOLOGIE MOLEULAIRE :

A/ HYBRIDATION MOLEULAIRE :

1/ Définition.

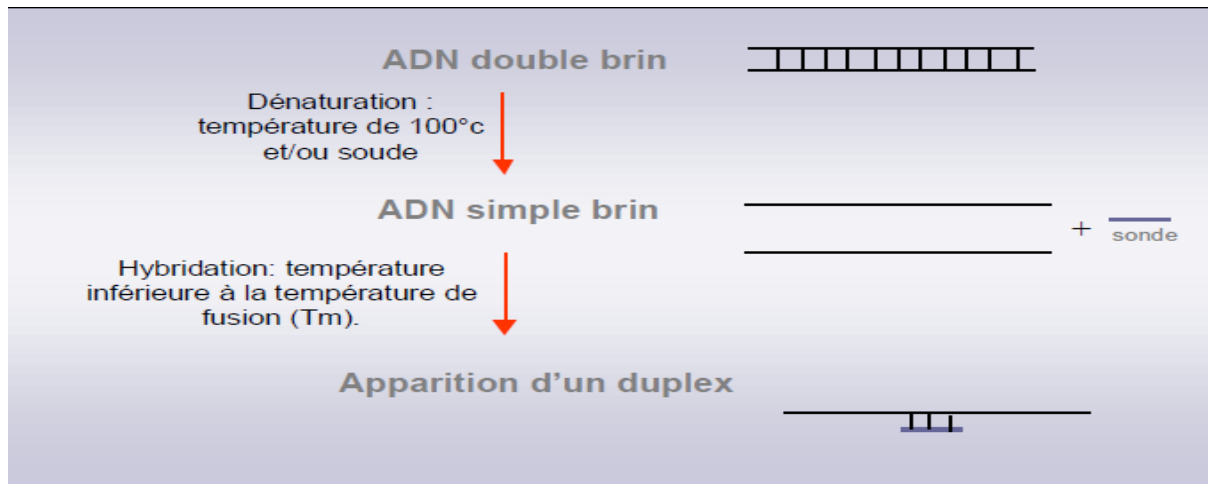
Réaction au cours de laquelle des molécules d'acides nucléiques (ADN ou ARN) simple brin s'associent de façon stable et spécifique par complémentarité de bases (A-T, C-G)

Sonde

Fragment polynucléotidique défini complémentaire d'une séquence d'ADN ou d'ARN cible, elle est marquée de manière radioactive (P32) ou avec des marqueurs « froids » (enzymes).

2/ Principe.

Cette technique permet la détection d'une séquence cible dans un mélange d'acide nucléique.



B/ SOUTHERN BLOT :

Principe d'analyse de l'ADN qui consiste à détecter une séquence spécifique.

1/ Principe.

- Purification de l'ADN.
 - Hydrolyse de l'ADN avec une enzyme de restriction.
 - Séparation des fragments générés par électrophorèse en gel d'agarose.
 - Dénaturation ADN double brin -> ADN simple brin.
 - Transfert sur support solide (membrane) par capillarité.
 - Hybridation avec une sonde spécifique de la séquence à détecter marquée au ^{32}P .
- Il y a formation d'un duplex stable qui résiste aux lavages effectués pour éliminer les excès de sonde.
- Révélation par autoradiographie.

2/ Applications.

- Mise en évidence de réarrangements chromosomiques.
- Diagnostics de maladies héréditaires:
- délétions ou insertions de grandes tailles
- Mutations au niveau d'un site de restriction.

3/ Inconvénients.

Nécessité de disposer d'une grande quantité d'ADN très pur, long et coûteux.

C/ NORTHERN BLOT :

- Le principe est le même que pour le Southern Blot mais ici ce sont les **ARN** qui sont étudiés. donc plus besoin de digérer par enzyme de restriction.
- La visualisation d'un ARN par une sonde permet :
 - apprécier sa distribution dans les tissus,
 - étudier son abondance relative
 - déterminer sa taille
 - détecter les intermédiaires de maturation et les différentes formes d'épissage de l'ARN.

D/ DOT BLOT :

- Cette technique permet de quantifier un ARN ou fragment d'ADN donné sans séparation préalable sur gel d'électrophorèse.

E/ LA PCR :

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est l'amplification d'un fragment d'ADN voulu in-vitro

1/Principe

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

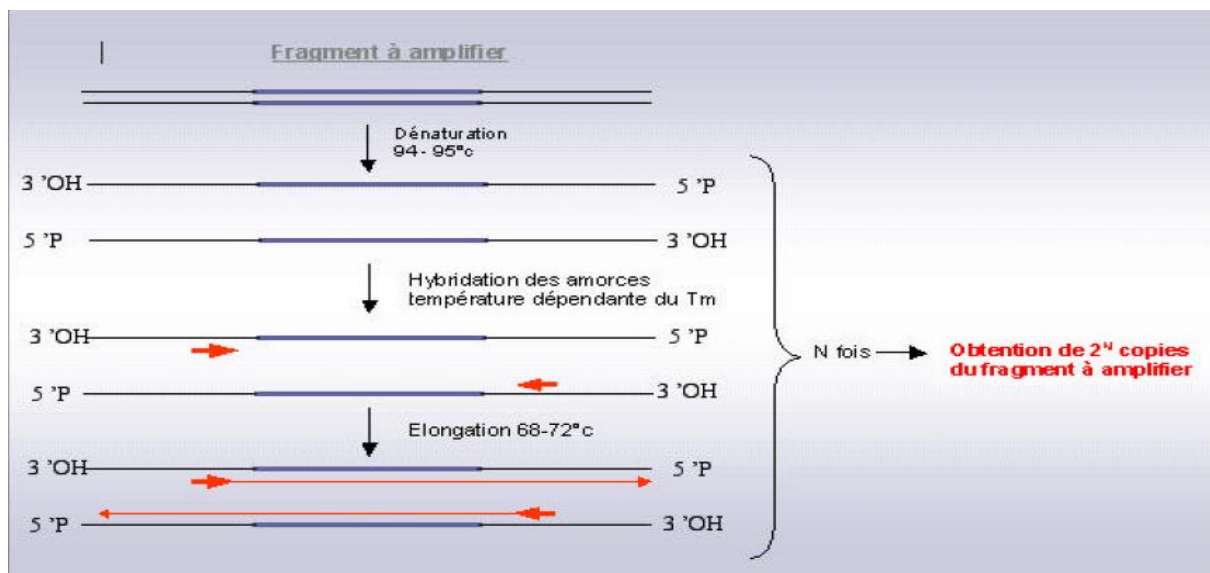
Les amorces sont des oligonucléotides qui se lient spécifiquement de part et d'autres de la séquence à amplifier.

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/Avantages et inconvénients.

- Rapidité (2 à 3 heures).
- Très grande sensibilité, des précautions doivent être prises pour éviter des contaminations.
- La séquence à amplifier doit être connue.
- La taille de la séquence à amplifier est limitée (2000 à 3000 pb).

3/ Prélèvements.

L'origine peut être très variée sang, liquide amniotique, tissus

4/ Applications.

- Diagnostic génotypique : détection de mutations dans le cas de maladies héréditaires.
- Oncologie : détection de remaniements chromosomiques.
- Médecine légale : empreintes génétiques, détections de polymorphismes.
- Pathologies infectieuses et parasitaires : détection de virus ou parasites