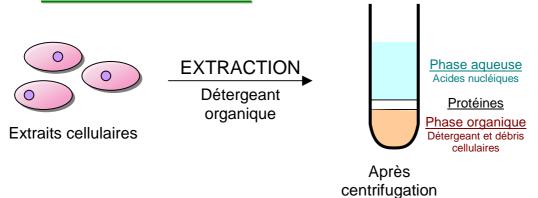
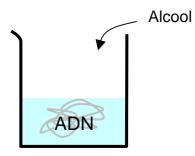
Outils de la biologie moléculaire

I Préparation du matériel biologique

A. Extraction de l'ADN



Le détergeant organique a pour rôle de <u>lyser les cellules</u> et de <u>séparer les acides nucléiques des protéines</u> par effet hydrophobe. On utilise souvent du **phénol**, du **chloroforme** ou de l'**éther**, voire du **SDS**. On ajoute souvent des **RNases** et des **protéases** afin de récupérer un ADN purifié. On <u>récupère le surnageant</u>.



On ajoute de l'*alcool* à la solution, souvent de l'**éthanol**. L'ADN étant insoluble à l'alcool, celui-ci <u>précipite</u>, et on peut le récupérer puis le doser par spectrophotométrie.

Remarque: pour une $DO_{260} = 1$, on a 50 μ g.mL⁻¹ d'ADN

B. Extraction des ARN

L'extraction des ARN est <u>très différente de celle des ADN</u>, 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 <u>chromatographie d'affinité</u> avec des polyT ou des polyU.

C. Synthèse d'oligonucléotides

Il est possible de fabriquer une <u>séquence de nucléotides simple brin jusqu'à 40 bases</u>. Il est possible d'y ajouter des **nucléotides modifiés**, qui peuvent servir plusieurs fonctions : <u>blocage d'une extrémité</u>, <u>marquage</u> avec un anticorps ou fluorescent.

D. Analyse des acides nucléiques

<u>Ultracentrifugation</u>

- → Gradient de saccharose
- (en fonction de la taille et du poids moléculaire)
- → Gradient de densité au CsCl (en fonction de la densité)

Chromatographie

- → D'affinité
- → Filtration sur gel (sépare nucléotides libres)
- → Échanges d'ions (récupère petites quantités)
- → HPLC High Performance Liquid Chromatography (sépare fragments d'ADN)

Électrophorèse

- → 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.

$$\log u = \log u_0 + K_r * C$$

log u est la mobilité de la molécule

 \mathbf{K}_{r} est le <u>coefficient de retardement</u> sur le gel, en fonction de la taille de la molécule

Remarque : il faut toujours mettre des témoins pour étalonner une électrophorèse

II_ Outils enzymatiques

A. Nucléases

On distingue deux types de nucléases :

- _ les **endonucléases** qui coupent à <u>l'intérieur de la séquence nucléotidique</u>
- _ les **exonucléases** qui dégradent la séquence en détachant les nucléotides à partir d'une <u>extrémité</u>

1) Exonucléases

Les exonucléases les plus utilisées sont :

- **► Exonucléase III**: attaque en 3', activité 3' phosphorylase, permet la formation d'ADN simple brin et les délétions
- Nucléase Bal31 : attaque en 3' ou 5', donne des bouts franchement découpés, permet les délétions

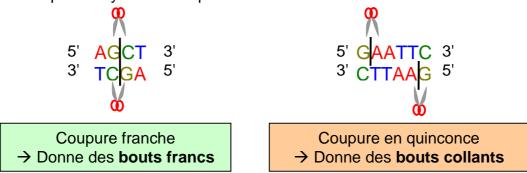
2) Endonucléases de restriction

Ces endonucléases ne peuvent attaquer que les séquences d'ADN double brin. Il existe trois types d'enzymes de restriction :

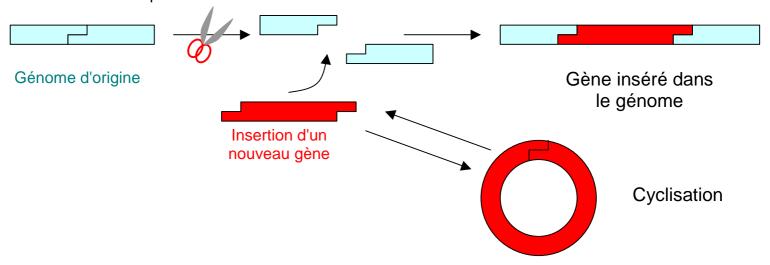
- → <u>Type I</u>: ces enzymes assurent la restriction et la méthylation, et coupent assez loin de la séquence reconnue
- → <u>Type II</u>: deux enzymes différentes assurent chacune la restriction et la méthylation, elles coupent dans le site de reconnaissance
- Type III : ces enzymes assurent la restriction et la méthylation, elles coupent entre deux séquences reconnues.

Remarque : La **méthylation** est une méthode permettant de <u>protéger le génome</u> <u>bactérien</u> de la restriction de ces enzymes.

On n'utilise que les enzymes de type II. Ces enzymes coupent l'ADN <u>nettement et très précisément</u>, de <u>manière spécifique</u>; en effet une séquence nucléotidique souvent **palindromique**, de *4 ou 6* (5 ou 8 plus rarement) bases, est reconnue par l'enzyme. La coupure se fait au niveau du site de restriction.



Les bouts collants peuvent être exploités pour recoller des séquences de manière spécifique. Il faut tout de même faire attention à la cyclisation possible de telles séquences.

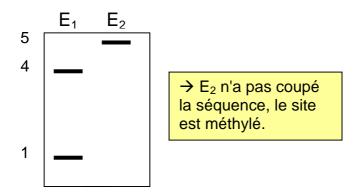


<u>Remarque</u> : deux enzymes reconnaissant le même site de restriction sont dites isoschizomères.

restriction

Il est alors possible d'obtenir des **profils de restriction**. En effet, pour chaque ADN donné, les coupures seront différentes, et la longueur des chaînes observées par électrophorèse sera différente.

On peut aussi utiliser les enzymes schizomères pour mettre en évidence des **sites de méthylation**. Une seule des deux doit être sensible à la méthylation.



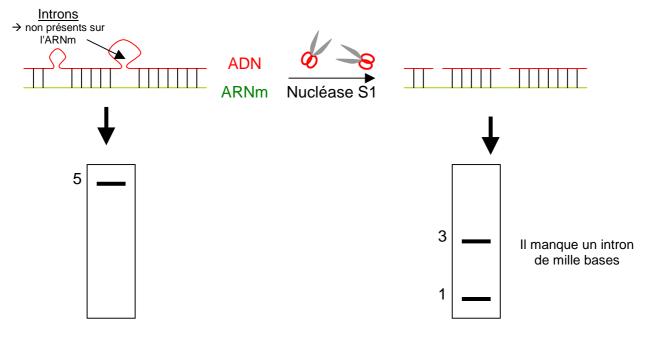
Enfin, on peut établir des **cartes de restriction** des génomes, qui répertorient les différents sites de restriction présents sur la chaîne. Aujourd'hui, les ordinateurs aident grandement à cette tâche.

Partie d'une carte de restriction											
399	HindIII		Pael	Sda	I_B	rel	Sall		Xbal		BamHI
CAA	GCT	TGC	ATG	CCT	GCA	GGT	CGA	CTC	TAG	AGG	ATC
GTT	CGA	ACG	TAC	GGA	CGT	CCA	GCT	GAG	ATC	TCC	TAG
Leu	Ser	Ala	His	Arg	Cys	Thr	Ser	Glu	Leu	Pro	Asp

3) Autres enzymes

D'autres nucléases sont moins spécifiques :

- → DNase I coupe l'ADN simple ou double brin après les pyrimidines, donne une extrémité 5'-P
- ▶ **DNase II** coupe l'ADN simple ou double brin et donne une extrémité 3'-P
- Nucléase S1 coupe tous les acides nucléiques simple brin
 - → Cela permet de repérer les introns :



Quelques RNases :

Les premières découvertes furent la RNase T1 (spécifique de G) et la RNase III (coupe l'ARN double brins). Cependant elles sont très peu pratiques car elles ne sont pas très spécifiques.

On utilise plutôt la **RNase A**, qui est <u>très active et thermorésistante</u>, qui clive <u>l'ARN simple brin</u> après tous les résidus pyrimidines, et elle détruit les ARN dans les <u>hybrides ADN-ARN</u>. Très similaire, on utilise aussi la **RNase H** qui détruit l'ARN dans les réactions de transcription inverse.

B. Polymérases

Les polymérases permettent de créer, de répliquer ou d'étendre une chaîne de nucléotides.

1) Les ADN polymérases

Les ADN polymérases les plus utilisées sont :

ADN polymérase I	Fragment de Klenow: fragment de l'ADN pol I	ADN polymérase du phage T4
Polymérase en 5'→3'	Polymérase en 5'→3'	Polymérase en 5'→3'
		→ Très active
Exonucléase en 3'→5'	Exonucléase en 3'→5'	Pas d'exonucléase en 3'→5'
		→ Pas de correction d'erreurs
Exonucléase en 5'→3'	Pas d'exonucléase en 5'→3'	Exonucléase en 5'→3'
	→ Pas de risque de dégradation	→ Très active
	de l'ADN néoformé	

De nouvelles polymérases ont récemment trouvé une application, elles proviennent d'archéobactéries :

- Taq polymérase :
 - → Polymérase en 5'→3'

 - ▶ Pas d'exonucléase en 3'→5' (pas de correction d'erreurs)
 - → Optimale à 72℃, très thermorésistante
- Vent polymérase :
 - → Polymérase en 5'→3'
 - → Exonucléase en 3'→5'

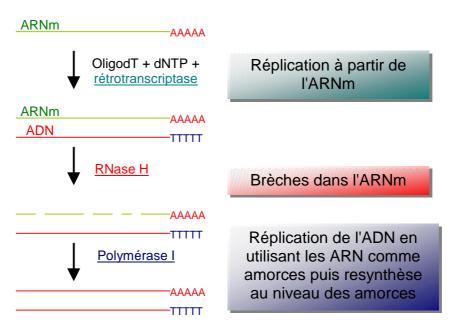
 - → Fonctionne à 75℃

Une autre polymérase très utilisée est la **terminal-transférase**, qui permet <u>d'ajouter des désoxynucléotides à l'extrémité 3'-OH d'un ADN</u>. Cette particularité peut être facilement mise à profit pour ajouter une séquence à un ADN.



Une polymérase particulière est la **rétrotranscriptase**. Cette polymérase est codée par le gène *pol* des rétrovirus. Elle polymérise de 5' en 3', <u>sans autocorrection</u> (conférant au virus son évolutivité), sur une <u>matrice d'ARN ou d'ADN</u>. L'ARN initial est alors <u>converti en ADN double brin</u>, car il finit dégradé par une RNase H associée à l'enzyme.

Ses propriétés sont très utiles pour le séquençage, la PCR ou l'extension d'amorces.



2) Les ARN polymérases

Ces polymérases ont besoin d'un <u>promoteur spécifique</u> pour transcrire l'ADN en ARN. On les utilise pour transcrire des ADN, pour les traduire, ou pour réaliser des sondes.

C. Ligases

Les ligases catalysent la formation d'une <u>liaison phosphodiester</u> entre une extrémité 3'-OH et 5'-P.

On utilise principalement:

- → ADN ligase d'E. Coli : lie les bouts collants. NAD comme cofacteur.
- → ADN ligase du phage T4 : lie les bouts collants et les bouts francs. ATP comme cofacteur.

D. Kinases et phosphatases

On utilise:

- → Phosphatase alcaline : élimine les groupements phosphates en 5' et empêche la liaison du vecteur sur lui-même lors du clonage.
- ▶ Kinase de T4 : ajoute un groupement phosphate en 5'

III Outils biologiques

A. Organismes modèles d'étude

Certains organismes sont couramment utilisés en laboratoire. Ils constituent des modèles d'étude pratiques, souvent représentatifs de leur règne :

→ Escherichia Coli : bactérie

→ Saccharomyces Cerevisiae : levure

→ Caenorhabditis Elegans : nématode

Arabidopsis Thaliana: plante

→ Drosophila Melanogaster: insecte

→ Mus Musculus : mammifère

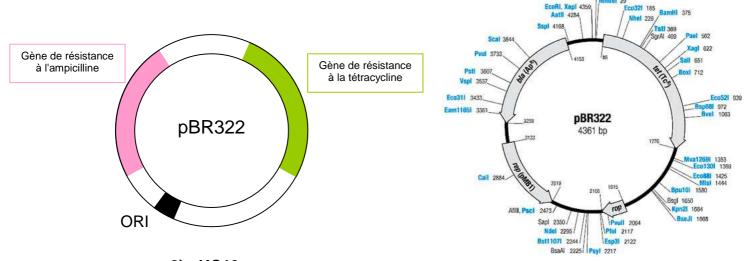
B. Plasmides

Les bactéries possèdent, en plus de leur nucléoïde, de petits chromosomes <u>circulaires</u> appelés **plasmides**. Ils sont constitués <u>d'ADN double</u> brin et se <u>répliquent</u> <u>de manière autonome</u>. Ces plasmides portent souvent des <u>gènes de résistance aux</u> antibiotiques.

Ces plasmides permettent d'insérer facilement de l'ADN, c'est pourquoi on a "inventé" différents plasmides pour accomplir des fonctions différentes.

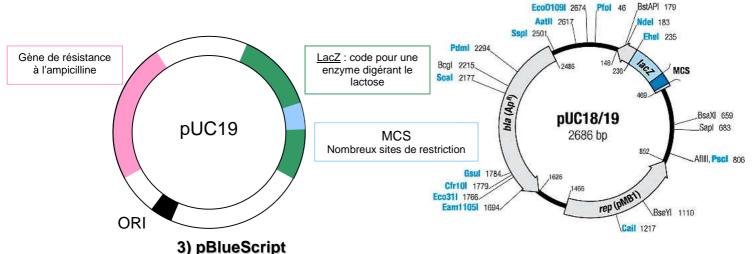
1) pBR322

Ce plasmide très simple est un des premiers plasmides qui fut largement utilisé. Il permet, grâce à ses gènes de résistance aux antibiotique, de sélectionner les bactéries qui ont inclus ou non le plasmide dans leur cytoplasme.

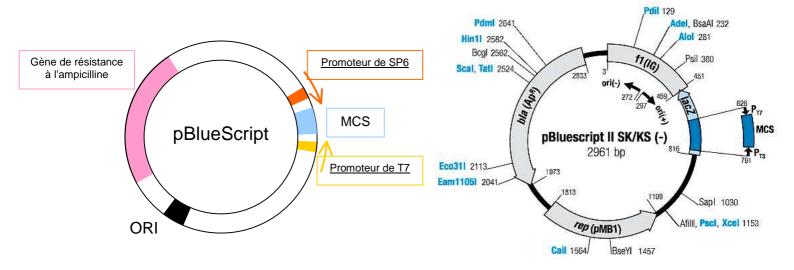


2) pUC19

Ce plasmide dispose d'un peu plus de séquences intéressantes pour le biologiste moléculaire. Il possède un site **MCS** (*Multiple Cloning Site*), qui est en fait une courte séquence remplie de <u>sites de restriction</u>. Cela permet <u>d'insérer plus facilement un *insert* dans le plasmide. De plus, ce site est présent à l'intérieur d'un gène codant pour une enzyme dont l'activité peut être mesurée. Ainsi, on peut sélectionner les bactéries qui ont inclus le plasmide *recombiné*.</u>

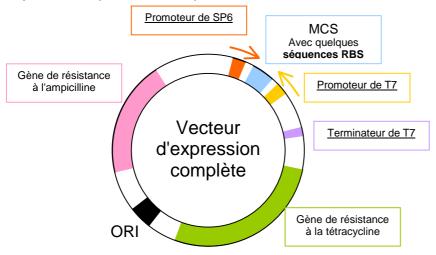


Ce plasmide est déjà plus élaboré. Entourant le MCS qui peut accueillir un insert, des **promoteurs** permettent la <u>transcription</u> dans l'un ou l'autre sens. Ces promoteurs proviennent de virus et ont une haute affinité. On appelle ce plasmide un **vecteur d'expression**, à cause de ses capacités à exprimer des séquences insérées.



4) Vecteur d'expression complète

Ce plasmide encore plus complet, permet la transcription, mais aussi la <u>traduction</u> du gène introduit. En effet, le site MCS dispose de quelques **séquences RBS** qui permettent au ribosome de se lier à l'ARNm. Un **terminateur** a aussi été ajouté afin que la transcription s'arrête.



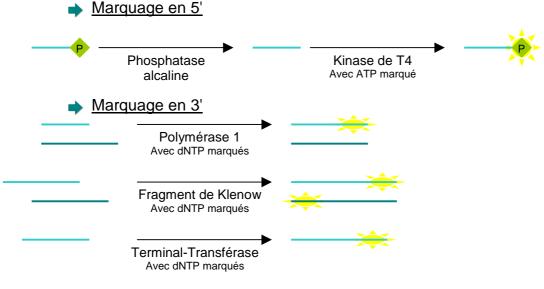
IV_ Techniques de biologie moléculaire

A. Hybridation moléculaire

Cette méthode a pour but de détecter et de <u>cartographier</u> un fragment de génome dont on possède la sonde. Le principe est simple : une **sonde** (d'ADN ou d'ARN) marquée s'hybride avec le génome, et on cherche à savoir où est-ce qu'elle s'hybride.

Marquage de la sonde :

Ce petit fragment d'ADN ou d'ARN est lié ou contient une molécule reconnaissable, par exemple un marqueur <u>radioactif ou fluorescent</u>. On peut marquer la sonde de différentes façons :



Marquage au hasard

hauffage puis efroidissement brutal		Amorces		Fragment de Klenow	
→ Marquage	interne (nick	translation))	≜	

Fragment de

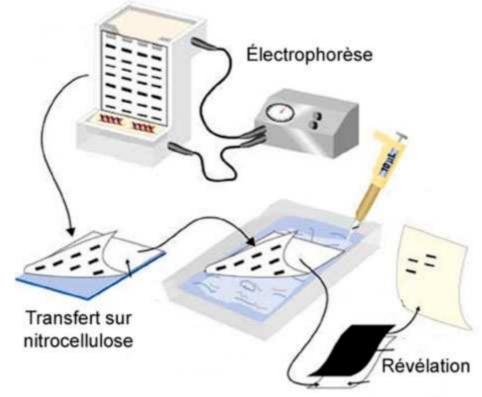
Klenow

Identification des fragments hybridés :

DNase I

Maintenant que la sonde est marquée et hybridée au génome, celui-ci va être découpé par des enzymes de restriction, puis va être identifié par **Southern Blot**.

Cette technique consiste à séparer les brins de différentes tailles par <u>électrophorèse</u>, puis on observe quelles sont les raies marquées.



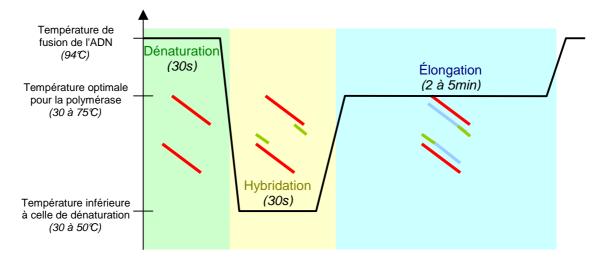
Applications :

- → Sonder de nombreuses banques d'ADN
- → Étudier l'organisation des régions du génome
- → Analyser l'accumulation des ARN transcrits dans une cellule
- → Détecter les intermédiaires de la maturation, de l'épissage, etc ...

B. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR permet d'amplifier in vitro de l'ADN en tirant parti du mécanisme de réplication. La PCR requiert alors une matrice d'ADN (simple ou double brin), une <u>amorce</u> pour chaque brin antiparallèle (entre 8 et 12 nucléotides), une ADN polymérase (souvent thermorésistante) et enfin des dNTP.

Le mélange est tout simplement placé dans une machine qui va initier plusieurs <u>cycles de température</u>. À chaque cycle, le nombre d'ADN double.



Applications :

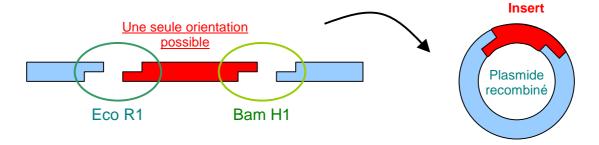
- → Amplifier une petite quantité d'ADN
- → Analyse de la taille et de la quantité du fragment
- → Aide au clonage (pas de mécanismes de restriction)
- → Alternative à l'emploi de banques d'ADN
- → Création de mutants en utilisant des amorces dégénérées

C. Le clonage et l'ADN recombinant

1) Utilisation de plasmides

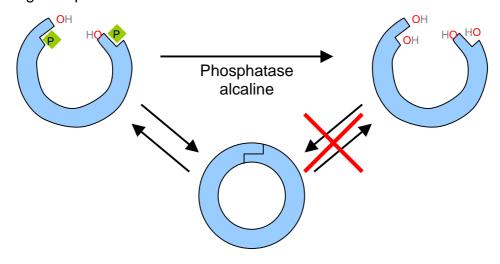
Recombinaison :

La séquence à cloner est insérée dans un plasmide. Cette séquence s'appelle un **insert**, et on dit que le plasmide est **recombiné**. Les <u>bouts collants</u> doivent être créés par des <u>enzymes de restriction différentes</u> si l'on veut orienter la séquence d'une manière spécifique.



Un autre problème peut survenir par le fait que le plasmide peut à <u>nouveau se</u> <u>circulariser</u>, et empêcher l'introduction de l'insert. Pour l'empêcher, on le soumet préalablement à une **phosphatase**, qui va empêcher la liaison sur lui-même.

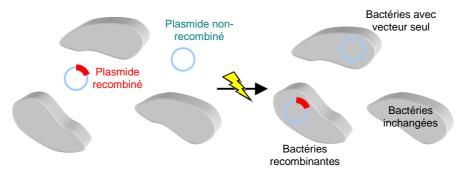
On remarque que l'insert ne peut alors pas former partout de liaison phosphodiester avec le plasmide. C'est en fait le <u>système de réparation</u> de la cellule qui va corriger ce problème.



Enfin, il est <u>difficile d'insérer une grande séquence</u> à l'intérieur d'un plasmide. Dans ce cas, on utilise des **phages** en tant que vecteur. L'ADN d'un phage est d'à peu près 45 kpb, tandis qu'un plasmide contient 4 à 5 kpb.

Insertion dans une cellule :

Le plasmide est ensuite inséré dans une bactérie, par <u>choc thermique ou</u> <u>électrique</u>. Cependant, tous les plasmides n'ont pas lié l'insert, et certaines bactéries peuvent ne pas absorber le plasmide. Ils faut alors recourir à une **sélection**.



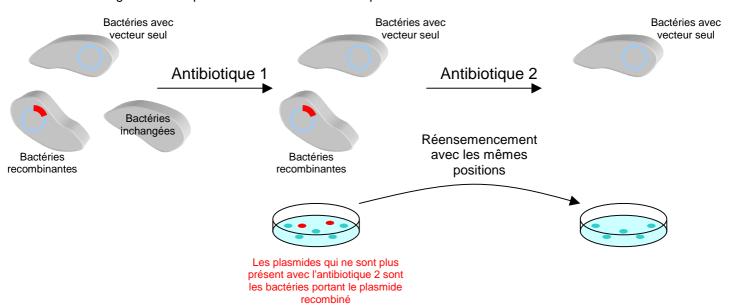
Sélection :

Les plasmides utilisés portent souvent des gènes de résistance aux antibiotiques. Il suffit donc de soumettre les bactéries à un antibiotique, celles qui résisteront seront celles qui auront intégré le plasmide.

Enfin, pour différencier celles qui ont intégré un plasmide recombiné d'un plasmide seul, on fait en sorte d'insérer la séquence dans un gène, de manière à entraîner un changement de phénotype.

Par exemple, on peut intégrer la séquence dans un gène codant pour une protéine, ou codant pour une résistance à un antibiotique.

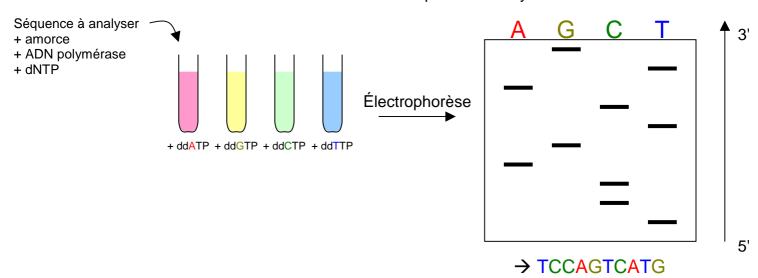
<u>Ex</u> : le plasmide contient des gènes de résistance aux antibiotiques 1 et 2. La séquence a été insérée dans le gène codant pour la résistance à l'antibiotique 2.



D. Séquençage de l'ADN 1) Méthode de Sanger

Pour séquencer l'ADN, on utilise encore la **méthode de Sanger**. À partir d'un ADN simple brin et d'une amorce, on polymérise un brin complémentaire avec un ADN polymérase. Cependant, le milieu contient des **didésoxynucléotides** qui stoppent la polymérisation après être incorporés.

On obtient alors plusieurs fragments d'ADN, de tailles diverses et portant à leur extrémité un didésoxynucléotide. En faisant une <u>électrophorèse</u>, on peut classer ces brins selon leurs tailles, et ainsi <u>déterminer la position du didésoxynucléotide</u>. On effectue ce mécanisme avec chaque type de didésoxynucléotide, et on peut alors déterminer l'ordre de ces nucléotides dans la séquence à analyser.



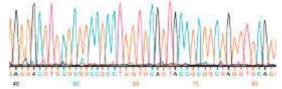
La <u>quantité de ddNTP doit être bien choisie</u>. S'il y en a trop, on ne polymérisera que de petites séquence ; s'il n'y en a pas assez, il n'y aura pas assez d'arrêts de polymérisation, et donc une analyse impossible.

2) Méthode automatique

Aujourd'hui, plus besoin de faire quatre fois la réaction et de lire les électrophorèses. La machine le fait automatiquement.

Après avoir amplifié notre séquence à analyser par PCR, on effectue la <u>réaction dans un seul milieu</u>, avec chaque didésoxynucléotide. Cependant, ils sont <u>chacun marqués par un fluorophore différent</u>. Ainsi la machine lit ces fluorophores avec un laser, et nous donne la séquence du brin.

Intensités mesurées des fluorophores par le laser



Cette méthode permet d'économiser beaucoup de temps, et permet une lecture précise de l'électrophorèse.

V_ Applications nouvelles

A. Production de protéines de fusion et recombinantes

On insère un gène codant pour une protéine après celui d'une protéine connue. On obtient alors une protéine de fusion que l'on peut sélectionner par chromatographie. On récupère ensuite la protéine recombinante en séparant les deux protéines accolées.

B. Établisement d'une banque génomique ou d'ADN codant

Attention, on distingue une banque génomique, qui regroupe des séquences d'ADN obtenues à partir des génomes, des banques d'ADN codant, obtenues à partir des ARNm produits.

C. Étiquettes EST (Expressed Sequence Tag) Établissement d'un catalogue de gènes exprimés dans un tissu particulier.