

Les outils de génétique moléculaire

Les techniques liées aux acides nucléiques

Sommaire

Préparation des acides nucléiques

Extraction / purification

Les enzymes agissant sur les acides nucléiques

Les enzymes de restriction

Les outils enzymatiques autres que les enzymes de restriction

Dosage et conservation

Séparation des acides nucléiques

Electrophorèse

Ultracentrifugation

Détection, caractérisation et identification des acides nucléiques

Marquage et suivi des AN

Marquage radioactif

Marquages froids : colorimétrie, fluorescence, chimioluminescence

Hybridation moléculaire

Southern Blot

Northern Blot

Dot Blot

Hybridation in situ

Amplification et sélection d'AN particuliers

PCR

RT-PCR

Clonage

Préparation des acides nucléiques

1. Extraction / Purification

L'ADN (ou l'ARN) doit impérativement être purifié à partir de matériels biologiques dans des conditions optimales de qualité et de quantité.

Dans la pratique, les acides nucléiques sont souvent extraits du sang total. Le procédé classique est l'extraction par le couple phénol-chloroforme. Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et il permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques. Il est ensuite éliminé par l'extraction avec du chloroforme (non miscible avec l'eau).

La séparation des phases aqueuse et organique peut se faire par centrifugation. La phase aqueuse contient les acides nucléiques. Des traitements par des agents clivant les protéines (protéolyse) peuvent être nécessaires. Les acides nucléiques peuvent être finalement récupérés sous forme solide à la suite de précipitation par l'alcool éthylique ou par l'alcool isopropylique. De nombreux réactifs sont disponibles, prêts à l'emploi, ce qui permet de simplifier les opérations de purification.

Il est possible d'extraire les acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques variés: cultures cellulaires, tissus divers etc... Les méthodes d'extraction doivent bien entendu être adaptées aux quantités disponibles de matériel biologique.

2. Les enzymes agissant sur les acides nucléiques

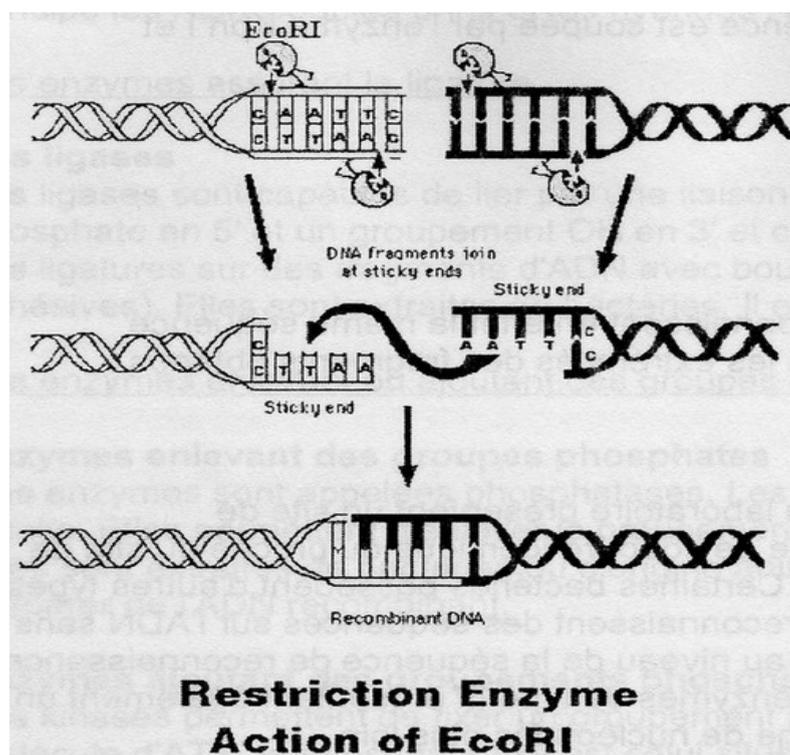
a. Les enzymes de restriction

Généralités

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). Plusieurs centaines de ces enzymes ont été caractérisés : ils reconnaissent une grande variété de sites de coupure.

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. Les endonucléases se différencient des exonucléases qui dégradent la molécule d'ADN à partir de l'une de ses extrémités (3' ou 5').



Séquences d'ADN reconnues par les enzymes 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.

Origine 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.

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

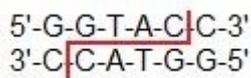
Notion d'isoschizomères

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.

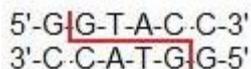
Exemple :

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

Kpn I:



Acc65 I:



Ces enzymes sont des isoschizomères, elles reconnaissent en effet la même séquence nucléotidique GGTACC. On voit tout de suite que les extrémités des fragments obtenus diffèrent.

Les classes d'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. 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. Les enzymes de type II présentent également un site de reconnaissance mais coupent une vingtaine de nucléotides plus loin.

Utilisations 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 méthylation de bases. Ces méthylation ont une signification complètement différente des méthylation 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 méthylation dans le génome des eucaryotes concernent les cytosines impliquées dans les doublets dinucléotidiques CG.

Notion d'enzymes compatibles

Deux enzymes de restriction sont dites compatibles quand elles génèrent après digestion des fractions aux extrémités cohésives complémentaires. Ces fragments peuvent être facilement ligaturés.

b. Les outils enzymatiques autres que les enzymes de restriction

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 radioisotopes.

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.

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.

Les enzymes enlevant ou ajoutant des groupes phosphates

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.

Les enzymes recopiant les acides nucléiques

Propriétés générales

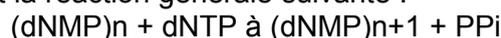
Les enzymes recopiant aussi bien une chaîne d'ADN ou d'ARN ont les propriétés générales suivantes :

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

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 :



avec N = A, C, T ou G. (PPi = groupe pyrophosphate).

Toutes les ADN polymérase 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 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'.

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 cheveux. On a ainsi formé un ADNc double brin. D'autres techniques existent pour préparer du ADNc à partir du mARN.

Les enzymes recopiant un ADN en un ARN

Les ARN polymérase réalisent des transcriptions de l'un des deux brins d'ADN en un brin d'ARN. Elles sont extraites des bactéries. Ces ARN polymérase possèdent les propriétés suivantes:

- 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 polymérase).
- Elles nécessitent des ribonucléosides triphosphates (ou NTPs) et également (comme les autres polymérase) des ions Mg^{2+} .
- Elles sont dénuées d'activité d'édition.
- Enfin, dans des conditions normales de transcription, les ARN polymérase ne peuvent démarrer la transcription que si l'ADN à transcrire possède le promoteur spécifique correspondant.

3. Dosage et Conservation

Estimation des quantités d'ADN

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

→ 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'ethidium et Acridine orange.

→ 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.

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

Séparation des acides nucléiques

1. Electrophorèse

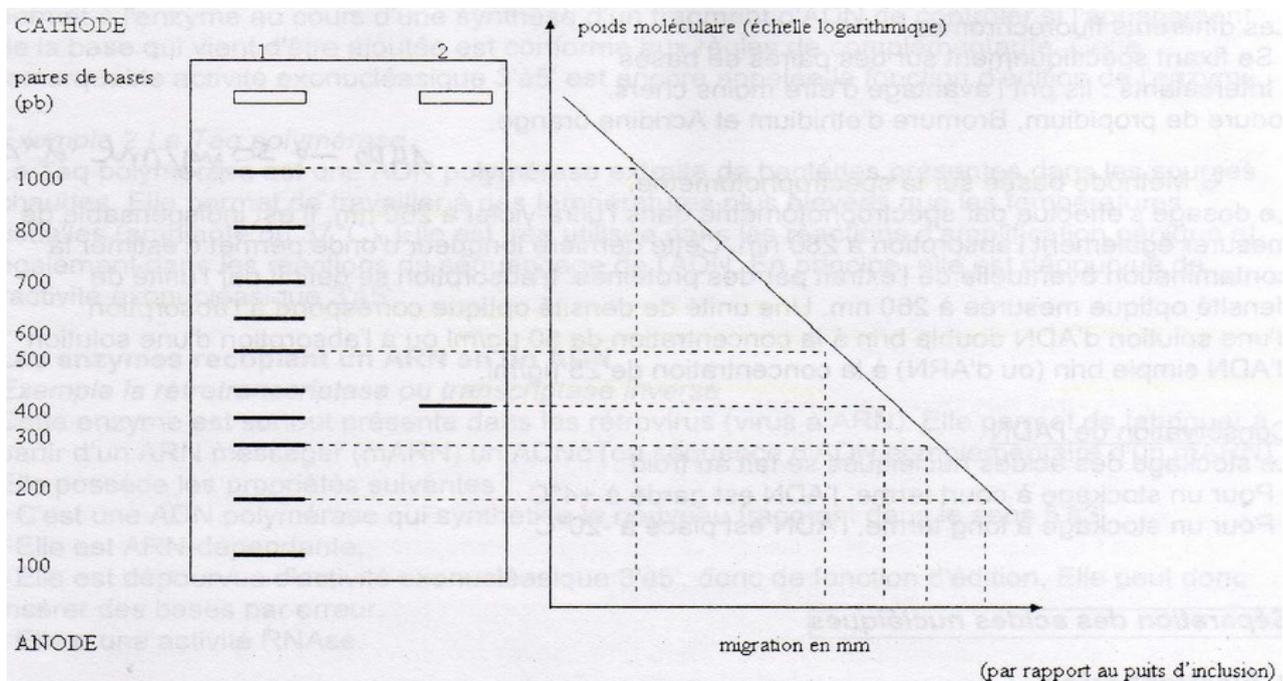
Les fragments d'ADN après digestion par les enzymes de restriction peuvent être séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Dans ce type de gel, les migrations des fragments d'ADN dépendent de la taille du fragment plus que de la charge de celui-ci. Plus le fragment a une taille élevée, moins la 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'ethidium 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). Le tampon utilisé pour la migration électrophorétique a un pH basique (par exemple: 8,3 dans le cas du tampon appelé TBE = Tris-Borate-EDTA).

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). Le support d'électrophorèse est constitué par de l'agarose et on applique au gel un champ électrique de nature variable. Ainsi, le champ électrique peut être appliqué dans une direction donnée pendant 1 minute puis dans une direction perpendiculaire au champ précédent pendant une minute et ainsi de suite. Le processus de réorientation des macromolécules dans le champ électrique dépend de leur taille.

Illustration d'une électrophorèse en gel d'agarose après migration et coloration par le bromure d'ethidium



Légendes des figures :

Figure de gauche

- PISTE 1: Marqueurs de taille (en paires de bases).
- PISTE 2: Echantillon d'ADN dont la taille est à déterminer.

Figure de droite

- Courbe d'étalonnage en abscisses, les distances par rapport au puits d'inclusion et en ordonnées les poids moléculaires (échelle logarithmique).

2. Ultracentrifugation

Pour rendre possible la séparation, il faut travailler avec de très grandes accélérations. Ceci est possible avec des centrifugeuses ou ultracentrifugeuses. Ces appareils sont composés des éléments suivants :

- un moteur capable de tourner à plusieurs dizaine de milliers de tours par minute
- un rotor capable de supporter des rotations aussi rapides (en titane généralement pour les rotors des ultracentrifugeuses)
- une enceinte dans laquelle est disposé le rotor, qui est réfrigérée et sous vide. En effet, pour les vitesses de rotation les plus rapides, le déplacement des extrémités du rotor (diamètre de l'ordre de 20-40 cm) est supersonique. Ceci entraînerait un échauffement insupportable dans l'air.

Cette enceinte est de plus blindée pour éviter des accidents en cas d'explosion du rotor. Cette technique de centrifugation a été mise au point par Svedberg (1923), qui l'utilisa pour déterminer des masses moléculaires. Elle fut appliquée à la biologie par le physiologiste belge Albert Claude (Prix Nobel 1974), qui isola grâce à elle les microsomes, c'est-à-dire ce qui reste de la cellule lorsque l'on sépare les mitochondries et les réticulums.

Detection, caractérisation et identification des acides nucléiques

1. Marquage et suivi des acides nucléiques

Le marquage est principalement employé dans toutes les techniques qui utilisent une sonde (hybridation, Northern,.....). On distingue le marquage dit 'chaud' utilisant des isotopes radioactifs, et les marquages 'froids' qui utilisent des molécules aux propriétés fluorescentes, luminescentes. Ces dernières sont de plus en plus employées car plus pratiques.

a. Marquage radio-actif

On distingue plusieurs méthodes selon la localisation du marquage (extrémités ou interne à la molécule) et selon la nature de la séquence marquée (simple ou double brin). Le Phosphore 32 est le radioisotope le plus utilisé. Incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radiomarqués. Il existe des sondes mono ou double brins Soufre 35, H 3 utilisés plutôt pour le séquençage et hybridation *in situ*.

Les sondes double brins

Marquage par amorçage au hasard (Random Printing):

Très employé dans les laboratoires pour par exemple les Southern et Northern Blot, il permet d'obtenir des activités spécifiques plus élevées, nécessaires pour détecter un gène sur quelques mg d'ADN génomique. Dans cette technique de marquage, les deux brins d'ADN de la sonde sont préalablement séparés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal. Puis, on ajoute un mélange d'oligonucléotides (hexanucléotides) de synthèse correspondant à toutes les combinaisons mathématiquement possibles (soit $4^6 = 4096$ nucléotides). Ces oligonucléotides vont s'hybrider avec le sonde pour une partie d'entre eux. Ces oligonucléotides fixés vont servir d'amorces au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I qui va reconstituer l'intégrité des deux fragments en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au ^{32}P . Des ADN polymérases par exemple dérivée du phage T7 sont actuellement les plus utilisées.

Marquage en 3':

* avec une ADN pol. : fragment de Klenow, T4 ADN pol., Taq pol., transcriptase reverse.

* avec une exonucléase

* avec une terminal transférase

L'ADN peut être marqué à son extrémité 5' à l'aide d'une kinase, par exemple, la T4 polynucléotide kinase extraite d'E. coli infecté par le bactériophage T4. En présence d'ATP avec du ^{32}P en position g ou [^{32}P]g-ATP, il est possible d'échanger le groupement 5'-phosphate présent sur le fragment d'ADN avec le phosphate radio-actif en position g sur l'ATP. Cette méthode est générale. Elle est plus efficace si les extrémités 5'- sont préalablement déphosphorylées, par exemple par l'action d'une phosphatase alcaline.

Marquage par translation de coupure (Nick Translation):

Utilisation de 2 enzymes :

* DNaseI dans des conditions ménagées pour générer quelques coupures simple brin dans le fragment d'intérêt

* DNA pol.I pour dégrader l'ADN dans sens 5'-3' au niveau de ces coupures et repolymériser en présence d'un nucléotide chaud.

Nous avons vu dans les outils enzymatiques utilisés en biologie moléculaire que l'ADN double brin traité par la Dnase I était clivé au hasard. La réparation des coupures réalisées par la Dnase I nécessite l'action de l'ADN polymérase I en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au phosphore radioactif (^{32}P). Les désoxynucléosides triphosphates utilisés sont marqués en position alpha au ^{32}P . Cette technique est appelée "Technique de Nick Translation".

Les sondes simple brin

- d'ADN:

> sondes à activité spécifique importante (Southern, Northern Blot)

> protection contre la nucléase S1, hybridation *in situ*. Avantage : ne se renature pas sur elle-même lors de l'hybridation.

- d'ARN: ribosondes.

> rendements d'hybridation meilleurs par rapport aux hybrides ADN-ADN et plus stables

> pour hybridation *in situ*

> cartographie des ARN

Attention:

Les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients :

- nécessité de se protéger du rayonnement émis = un maniement des sondes inconfortable.

- décroissance rapide du P32 ce qui nécessite un besoin de marquer les sondes fréquemment. Pour pallier à ces inconvénients, on peut utiliser les sondes 'froides'.

b. Marquages froids : fluorescence ; colorimétrie ; chimioluminescence

Fluorescence

Absorption d'énergie lumineuse par une molécule (fluorochrome) Passage à l'état de Molécule excitée

Retour à l'état fondamental par émission lumineuse (de plus grande longueur d'onde que l'onde de stimulation) = spectre de fluorescence

Colorimétrie

Colorants : biotine, digoxygénine, fluorescéine

Exemple : l'ADN cible est fixé sur une membrane et les sondes sont biotinylées. La détection est réalisée par ajout d'un complexe streptavidine-HRP (HorseRadish peroxidase ou Péroxydase de Raifort), l'enzyme permettant l'oxydation d'un chromogène. La mesure du signal est réalisée par colorimétrie.

Chimiluminescence

La chimiluminescence se produit au cours d'une réaction chimique lorsque l'excès d'énergie est libérée sous forme de lumière.

De nombreuses réactions produisent ce phénomène et chacune émet une lumière de longueur d'onde spécifique, et d'intensité proportionnelle à la quantité de molécules réactives présentes.

Attention: ces sondes 'froides' présentent un problème de sensibilité et leur utilisation ne fait pas toujours l'unanimité.

2. Hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou l'uracile U) et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G). La formation et la stabilité des duplex dépendent de nombreux facteurs en plus de la composition en bases : longueur des duplex, complexité de la séquence. L'hybridation est à la base de nombreuses techniques de biologie moléculaire impliquant la mise en présence d'au moins deux brins simples d'acides nucléiques dans des conditions physico chimiques précises. Le brin, dont on connaît au moins une partie de la séquence, est une sonde, l'autre brin, celui que l'on souhaite caractériser constitue la cible. L'un des deux brins est marqué par couplage chimique avec une molécule pouvant générer un signal.

Les sondes nucléotidiques

Définition

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.

Caractéristiques générales

Une sonde nucléotidique peut être 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.

Obtention d'une sonde

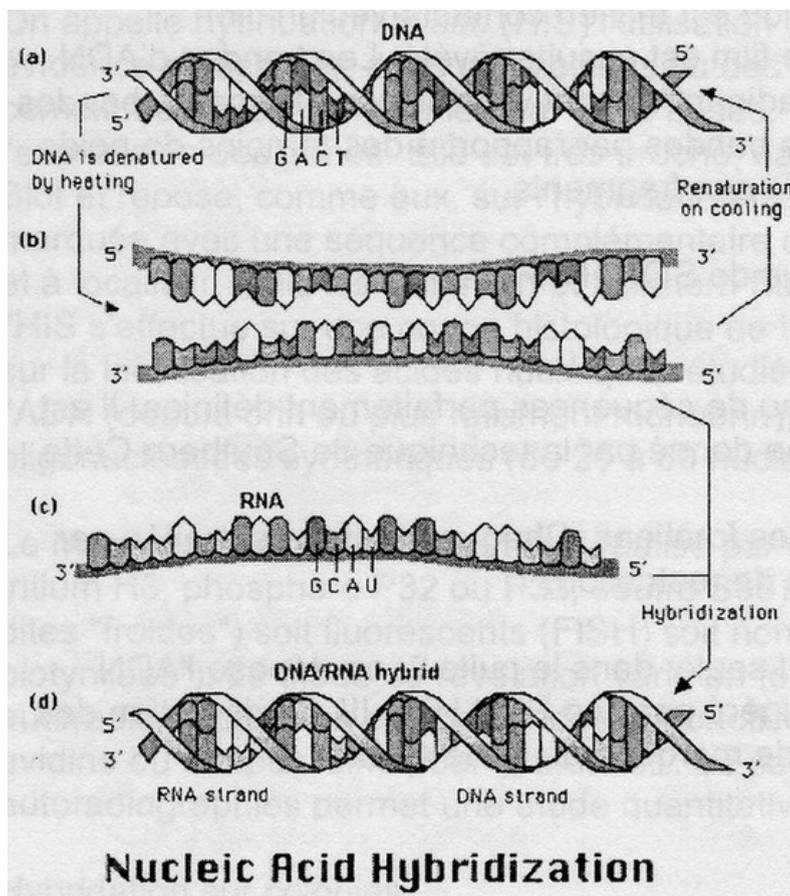
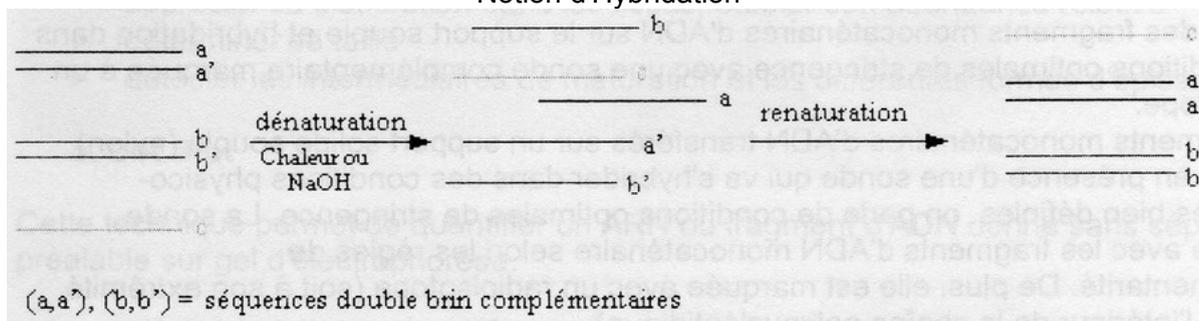
Il existe plusieurs possibilités pour obtenir une sonde nucléotidique :

- Une sonde oligonucléotidique peut être fabriquée par synthèse chimique, si la séquence de l'ADN à repérer est connue. Si elle est inconnue, on peut étudier la protéine correspondante et remonter grâce au code génétique à la séquence d'ADN. Dans ce dernier cas, le travail est particulièrement laborieux (nombre de codons élevé pour un même acide aminé).
- Une sonde peut être un ADNc. Une partie seulement du ADNc est utilisée (après action d'enzymes de restriction et clonage des fragments obtenus).
- Une sonde peut être théoriquement du mARN.

L'hybridation moléculaire avec la sonde

L'hybridation moléculaire sonde-fragment d'ADN à repérer nécessite des conditions physicochimiques parfaites (tampon, pH, température, etc.). Ces conditions sont appelées la stringence. Plusieurs facteurs peuvent également intervenir comme la longueur de la sonde et la complémentarité sonde-fragment avec possibilité de mauvais appariements.

Notion d'Hybridation



3. Southern Blot

Cette méthode a été initialement décrite par E.M. Southern en 1975. Elle consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des séquences complémentaires marquées par un radioisotope.

Les étapes successives de cette technique sont les suivantes :

- Extraction de l'ADN génomique.

Cette extraction s'effectue à partir des leucocytes circulants par exemple obtenus à partir de sang total.

- Digestion par des enzymes de restriction différentes du même ADN génomique. L'ADN génomique est digéré par des enzymes de restriction différentes (dans le tube 1, on réalisera une digestion par l'enzyme 1 ; dans le tube 2, une digestion par l'enzyme 2 ; etc...). On peut bien entendu réaliser des digestions par deux enzymes dans un même tube. Dans ces conditions, on obtient un très grand nombre de fragments, mais seuls quelques fragments correspondent à une partie ou à la totalité du gène étudié.

- Séparation électrophorétique des fragments d'ADN par électrophorèse dans un gel d'agarose.

Après séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADN bicaténaires obtenus par digestion enzymatique, on réalise une dénaturation des fragments par un traitement alcalin du gel d'électrophorèse. Ce traitement transforme les fragments d'ADN double brin (ou bicaténaires) en fragments d'ADN monobrin (ou monocaténaires).

- Transfert des fragments monocaténaires du gel d'agarose à un support souple (feuille de nylon

par exemple).

Le transfert des fragments monocaténaire du gel d'agarose à un support type nylon s'effectue par simple capillarité.

- Fixation des fragments monocaténaire d'ADN sur le support souple et hybridation dans des conditions optimales de stringence avec une sonde complémentaire marquée à un radioisotope.

Les fragments monocaténaire d'ADN transférés sur un support solide souple (nylon) sont mis en présence d'une sonde qui va s'hybrider dans des conditions physicochimiques bien définies, on parle de conditions optimales de stringence. La sonde s'apparie avec les fragments d'ADN rnonoecaténaire selon les règles de complémentarité. De plus, elle est marquée avec un radioisotope (soit à son extrémité 5', soit à l'intérieur de la chaîne polynucléotidique).

- Lavages et révélation (dans ce cas par autoradiographie).

Après de nombreux lavages, le support solide est mis en contact avec un film photographique pendant plusieurs jours. Le film est ensuite révéillé. Les bandes d'ADN monocaténaire hybridées avec la sonde radioactive sont visibles sous forme de bandes noires sur un fond blanc. La position de ces bandes par rapport à des témoins de poids moléculaire permet de déterminer la taille de ces fragments.

Nous citerons parmi les applications de la technique de SOUTHERN:

Exemple 1 : Carte de restriction de l'ADN.

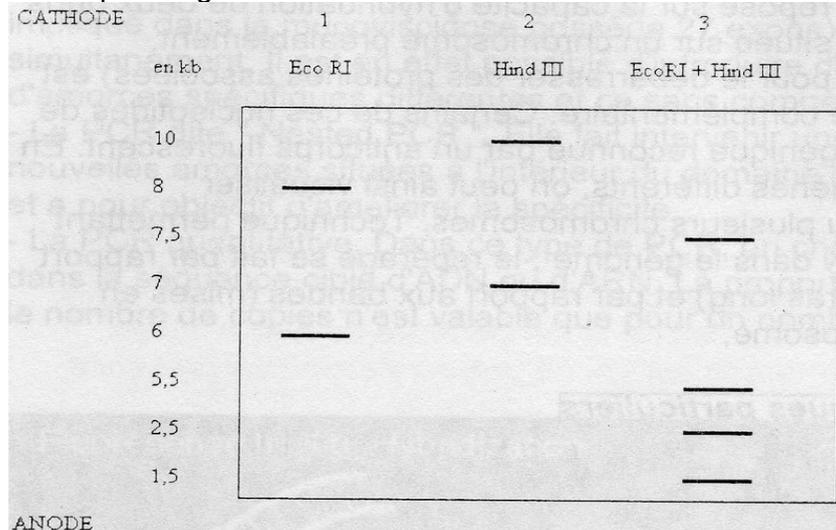
Les enzymes de restriction coupent l'ADN au niveau de séquences parfaitement définies. Il est donc possible d'établir une véritable carte d'un gène donné par la technique de Southern Cette carte porte le nom de carte de restriction.

En pratique, l'ADN à étudier est réparti en différentes fractions. Chaque fraction est traitée par une enzyme de restriction ou un couple d'enzymes de restriction.

Ainsi dans l'illustration ci-dessous:

Dans le puits 1, on dépose l'ADN digéré par Eco RI seule; dans le puits 2, on dépose l'ADN digéré par Hind III seule et dans le puits 3, l'ADN digéré par Eco RI et Hind III. La détection des différents fragments est réalisée à l'aide d'une sonde marquée du gène étudié.

Illustration des fragments après migration



4. 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 de :

- 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.

5. Dot Blot

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

6. Hybridation *in situ* (HIS)

On appelle hybridation *in situ* (HIS) l'utilisation de sondes d'acides nucléiques pour mettre en évidence et localiser, dans des cellules ou des tissus, des séquences d'acides nucléiques, complémentaires de la sonde par leurs bases. L'HIS est un outil incomparable pour étudier l'expression des gènes. Elle est très proche, dans son principe, des Southern et des Northern Blot et repose, comme eux, sur l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique (ADN ou ARN) marquée avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques que l'on cherche à identifier et à localiser. Mais les Southern et Northern Blot se font sur des broyats de tissus, alors que l'HIS s'effectue sur une coupe histologique de tissu, apportant ainsi des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés. Les sondes utilisées sont le plus souvent de l'ADN (double brin ou plus rarement monobrin), un ARN-messager (riboprobes) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides).

Le marquage des sondes peut être réalisé par des isotopes radioactifs ("sondes chaudes" : tritium H3, phosphore P32 ou P33, soufre S35) ou par des produits non radioactifs (sondes dites "froides") soit fluorescents (FISH) soit non-fluorescents comme la biotine ("sondes biotynilées"). Le mode de révélation varie en fonction de la nature du marquage, autoradiographies en cas de sondes radioactives, microscopie à fluorescence en cas de FISH, avidine ou streptavidine pour la biotine... Le comptage des grains d'argent sur les autoradiographies permet une étude quantitative.

Hybridation sur colonies

Transfert de colonies de cellules d'une boîte de Pétri sur un filtre ou une membrane avant de procéder à une hybridation moléculaire de leur matériel génétique avec une sonde marquée.

Hybridation sur chromosomes (FISH)

La FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*) repose sur la capacité d'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires. La région à étudier (située sur un chromosome préalablement légèrement dénaturé par traitement chimique pour le débarrasser des protéines associées) est repérée grâce à une sonde oligonucléotidique complémentaire. Certains de ces nucléotides de cette sonde sont couplés à une molécule antigénique reconnue par un anticorps fluorescent. En utilisant diverses sondes, greffées à des antigènes différents, on peut ainsi visualiser simultanément plusieurs séquences sur un ou plusieurs chromosomes. Technique permettant de déterminer la position d'un fragment d'ADN dans le génome ; le repérage se fait par rapport au bras du chromosome (p: bras court et q: bras long) et par rapport aux bandes (mises en évidence par la coloration Giemsa) du chromosome.

Amplification et sélection d'acides nucléiques particuliers

1. PCR

Cette technique décrite en 1985 (K. MULLIS et collaborateurs) permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 18 à 30 nucléotides en général). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces.

Réalisation pratique

La technique comporte des cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases :

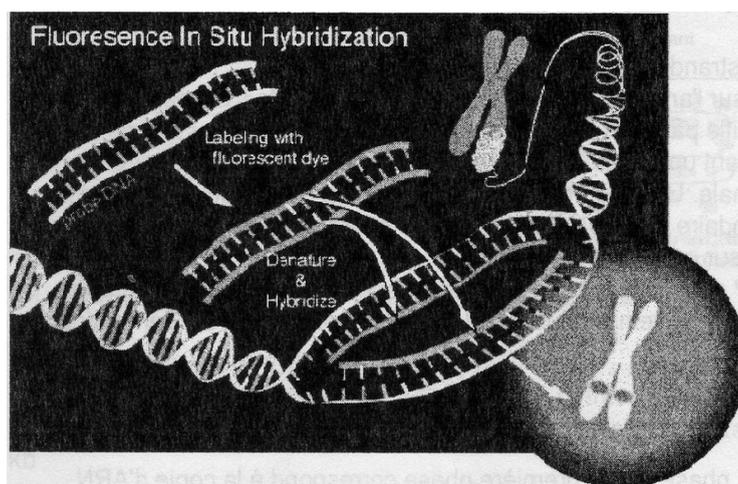
- Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN (92-95°C)(30 secondes-1 minute).
- Une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques entre 50-60°C. Cette température dite d'annealing (ou accrochage des amorces) est un paramètre important pour la réussite de la PCR et doit être calculée en fonction du Tm (Température de fusion ou Melting température) des deux amorces. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire (30 secondes-1 minute).
- Une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces à 70-72°C (1-2 minutes). La durée de cette phase dépend de la taille du fragment à amplifier.

Cette technique a pris un essor considérable avec l'introduction d'une ADN polymérase résistante à la chaleur. Cette ADN polymérase ou Taq polymérase est extraite d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*). Elle permet une automatisation des différents cycles (dans des appareils appelés thermocycleurs). Le nombre de cycles est généralement compris entre 25 et 40. Cette méthode permet

d'amplifier l'ADN compris entre les deux amorces d'un facteur de 10^5 à 10^6 . Les conditions doivent être optimisées en fonction d'un certain nombre de paramètres: concentration en $MgCl_2$, concentration en amorces, spécificité des amorces, quantité d'ADN matrice etc... Le choix des amorces est particulièrement crucial pour obtenir des résultats satisfaisants (spécificité, taille, paramètres physico-chimiques.....). L'introduction de logiciels spécialisés et des bases de données nucléotidiques a permis de réaliser des choix plus rationnels. La Taq polymérase extraite de *Thermus aquaticus* présente une activité exonucléasique 5' 3', mais elle est dénuée d'activité exonucléasique 3' 5', c'est-à-dire de la fonction d'édition. Elle peut insérer des bases qui ne suivent pas la règle classique d'appariement et ceci au hasard. On estime qu'elle réalise une mauvaise incorporation toutes les 10^4 à 10^5 bases.

Cette technique a évolué considérablement. De nouveaux types de PCR ont été introduits. Nous citerons brièvement :

- La PCR dite " Multiplex " pour amplifier des gènes avec de nombreux exons (le gène CFTR impliqué dans la mucoviscidose possède 27 exons) ou plusieurs gènes différents simultanément. Il est en effet possible d'introduire dans le milieu d'amplification des couples d'amorces spécifiques différentes et ce sans compétition entre ces amorces.
- La PCR dite " Nested PCR ". Elle fait intervenir une seconde PCR réalisée en utilisant des nouvelles amorces situées à l'intérieur du domaine défini par les amorces de la première PCR et a pour objectif d'améliorer la spécificité.
- La PCR quantitative. Dans ce type de PCR, on cherche à estimer le nombre de copies présent dans la séquence cible d'ADN ou d'ARN. La proportionnalité entre le nombre d'amplifications et le nombre de copies n'est valable que pour un nombre de cycles PCR faible.



Utilisations des produits PCR

Les utilisations des produits PCR sont très variées, nous citerons quelques exemples (cette liste n'est pas exhaustive):

- Mise en évidence de mutations ponctuelles par hybridation des produits PCR avec des sondes oligonucléotidiques (technique dite du "dot-blot").

Les produits PCR peuvent après transformation en monobrins être hybridés avec des sondes oligonucléotidiques fixées sur un support solide. Ces sondes correspondent à des séquences normales et pathologiques (présence de mutations ponctuelles par exemple) pour un gène donné.

- Analyse de restriction.

Le produit PCR est soumis à une digestion enzymatique par une enzyme de restriction. Si une mutation ponctuelle modifie le site de restriction initialement présent, la taille des fragments d'ADN obtenus après digestion sera modifiée et décelable après électrophorèse des fragments d'ADN (sur gel d'agarose ou gel de polyacrylamide). A titre d'exemple, la mutation ponctuelle (GAG à GTG) sur le sixième codon du premier exon du gène β de la globine humaine entraîne l'apparition d'une hémoglobine anormale appelée hémoglobine S (mutation ponctuelle d'un acide aminé: Glu à Val). Cette anomalie est répandue dans le monde entier. Elle est responsable à l'état homozygote d'une pathologie grave: la drépanocytose homozygote.

Cette mutation entraîne une modification du site de restriction de l'enzyme Dde I: C / TNAG (N = A, T, C ou G). La mutation Hb S conduit à une mutation ponctuelle au niveau du codon 6 avec disparition du site de restriction pour l'enzyme Dde I. L'électrophorèse des produits PCR après digestion par l'enzyme Dde

Il permet d'affirmer ou d'infirmer la présence d'une mutation GAG à GTG sur le codon 6 par la comparaison des tailles des fragments. On peut donc confirmer l'état hétérozygote ou l'état homozygote pour cette mutation.

- Introduction du produit PCR dans un vecteur: clonage du produit PCR.
- Séquençage direct du produit PCR (voir cours sur le séquençage).
- Analyse électrophorétique des produits PCR: technique DGGE et technique SSCP.

Ces techniques d'analyse électrophorétiques des produits PCR sont particulièrement utiles pour mettre en évidence des mutations ponctuelles au niveau d'un gène. Des produits PCR (ou amplimères) particuliers sont formés si des mutations sont présentes sur l'ADN initial. Les produits PCR seront différents en fonction de la présence d'une séquence normale, d'une séquence mutée (homozygote, hétérozygote ou composite)(voir schémas).

Technique DGGE (pour "denaturing gel gradient electrophoresis").

La température de fusion d'un produit PCR (ADN double brin), c'est-à-dire la température moyenne de séparation des deux brins est fonction de sa séquence. Une mutation ponctuelle qui change donc la séquence entraîne une modification de la température de fusion. Cette modification est mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'un gradient d'agent dénaturant.

Technique SSCP (pour "single strand chain polymorphism").

La technique SSCP est basée sur l'analyse électrophorétique des produits PCR sous forme de fragments simple brin. On amplifie par PCR une région que l'on désire étudier et on compare la mobilité de l'ADN dénaturé portant une mutation par rapport à celle d'un fragment de référence comportant une séquence normale. Une mutation ponctuelle au sein d'une séquence modifie suffisamment la structure secondaire de l'ADN monobrin pour qu'il en résulte des changements de migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide.

Les techniques DGGE et SSCP sont concurrencées par des techniques de chromatographie liquide à haute performance avec des températures d'élution variables (DHPLC: "denaturing high pressure liquid chromatography").

2. RT-PCR

La RT-PCR se déroule en deux phases. Une première phase correspond à la copie d'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur le ADNc synthétisé.

Dans la première phase, l'ARN messager à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul mARN auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme de ADNc simple brin), une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension.

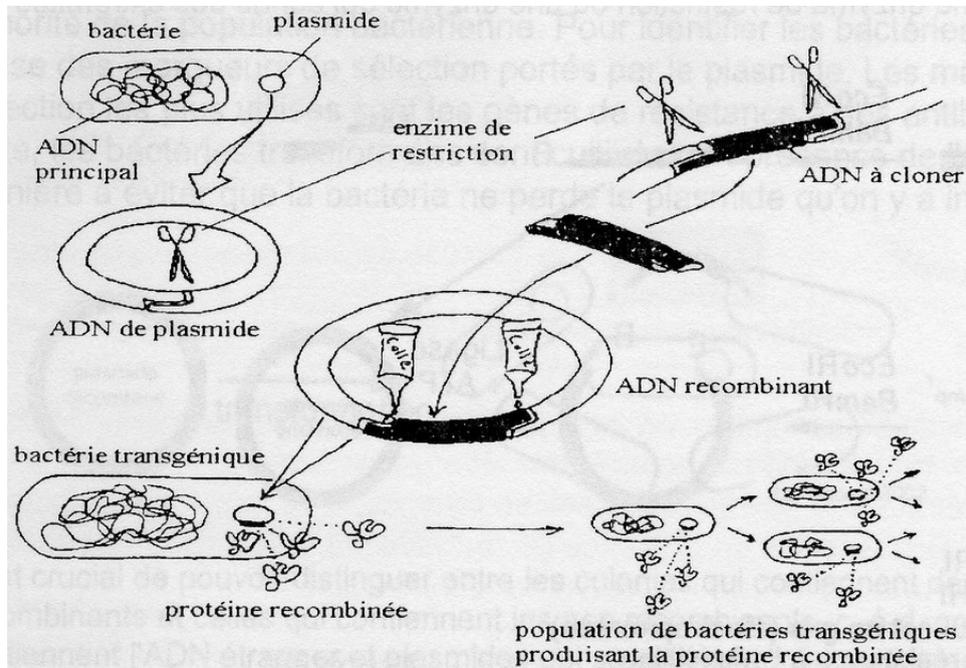
L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique. La technique RT-PCR a permis de montrer que la transcription de tous les gènes s'effectuait dans tous les tissus et ceci même pour les gènes qui présentent une très grande spécificité tissulaire. On parle dans ces conditions de transcription illégitime. Il est évident qu'avant les techniques d'amplification génique, la sensibilité des méthodes classiques n'avait pas permis de mettre en évidence un tel phénomène.

3. Clonage

Un clone correspond à un grand nombre de molécules ou de cellules identiques provenant d'un seul ancêtre (cellule ou molécule). L'opération qui consiste à obtenir ce grand nombre de cellules ou de molécules s'appelle le clonage.

Le clonage nucléaire consiste en l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur, ce vecteur étant propagé dans une cellule hôte. La culture de cette cellule et la purification ultérieure du vecteur permettent de produire des quantités quasiment illimitées du fragment d'ADN clone que l'on désire étudier.

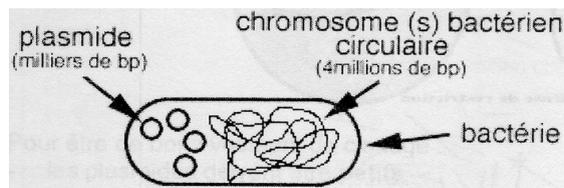
Une application dérivée du clonage nucléaire consiste à faire exprimer par une cellule hôte, c'est-à-dire contenant un ADN recombinant (ADN hybride obtenu au laboratoire par la combinaison de deux ADN appartenant à deux espèces différentes), une protéine issue d'une autre cellule. Dans ce cas, le gène clone est exprimé par la cellule qui l'a reçu.



Un des vecteurs de clonage le plus utilisé est le plasmide.

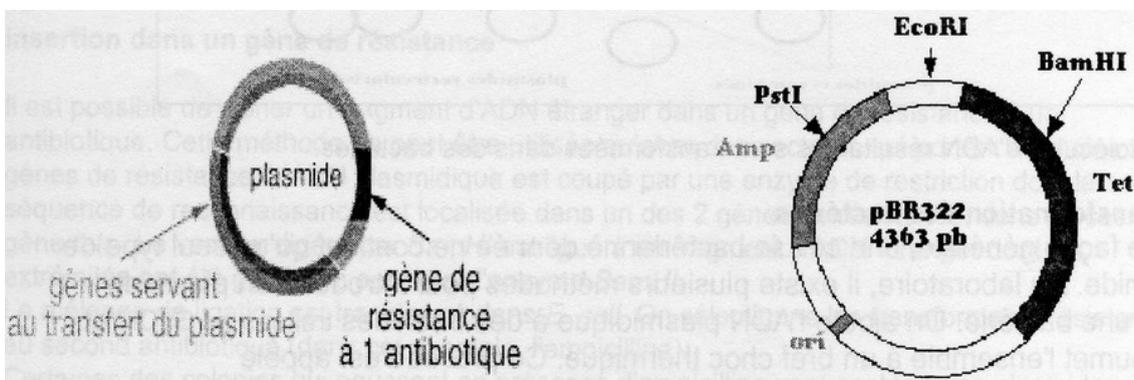
Les plasmides et leur intérêt

En plus de leur chromosome de 4 millions de paires de bases, les bactéries possèdent généralement de petites molécules d'ADN circulaire dont la taille varie entre 1 kb et 200 kb



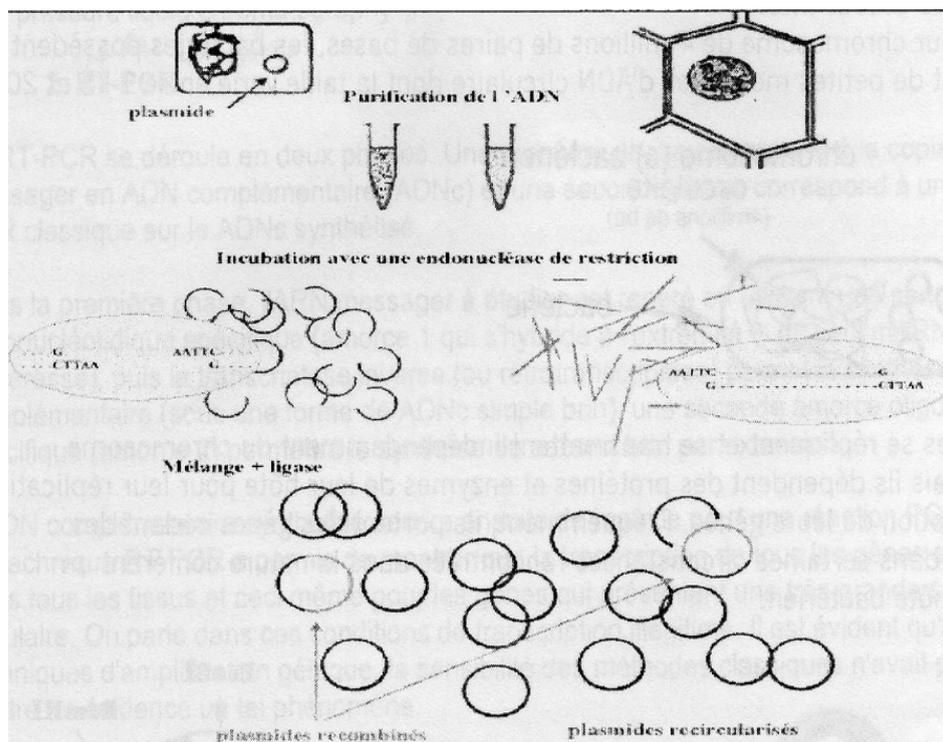
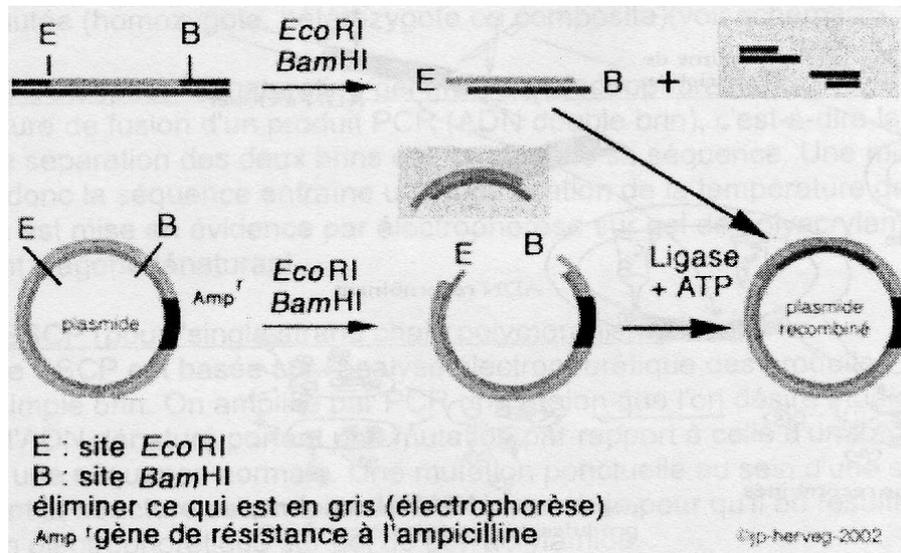
Ces plasmides se répliquent et se transmettent indépendamment du chromosome bactérien, mais ils dépendent des protéines et enzymes de leur hôte pour leur réplication et la transcription de leurs gènes. Fréquemment, ils portent des gènes codant des enzymes qui dans certaines circonstances rencontrées dans la nature confèrent un avantage à l'hôte bactérien.

Parmi ces propriétés avantageuses, il y a la résistance à des antibiotiques, la production d'antibiotiques, la dégradation de composés organiques complexes... Comme l'ADN plasmidique est de beaucoup plus petite taille que n'importe quel ADN chromosomique même très fragmenté, il est facilement séparable du reste du matériel génétique.



Obtention de l'ADN recombinant

L'ADN du plasmide est coupé par une enzyme de restriction et lié in vitro au fragment d'ADN étranger coupé par la même enzyme de restriction ou une enzyme qui donne des extrémités compatibles.



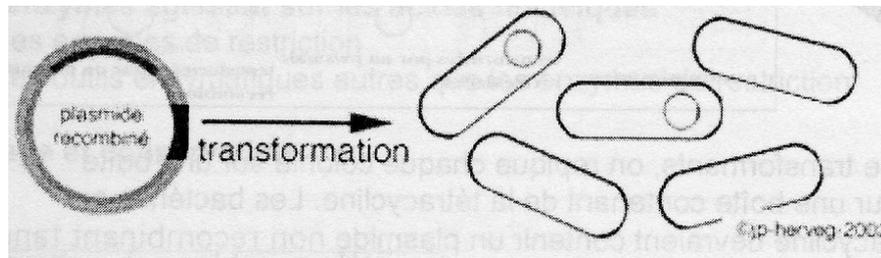
Les molécules d'ADN résultantes sont transformées dans des bactéries.

La transformation des bactéries

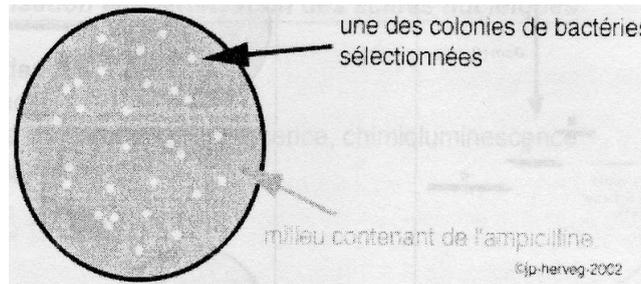
D'une façon générale, une cellule bactérienne donnée ne contient qu'un seul type de plasmide. Au laboratoire, il existe plusieurs méthodes pour introduire un plasmide dans une bactérie. On ajoute l'ADN plasmidique à des bactéries traitées au CaCl_2 et on soumet l'ensemble à un bref choc thermique. Ce procédé est appelé *transformation*.

L'ADN peut également être introduit dans des bactéries par électroporation. Ce procédé soumet les bactéries en suspension dans de l'eau à une différence de potentiel élevée pour ouvrir temporairement des pores dans la paroi des cellules. L'efficacité de transformation est inversement proportionnelle à la taille du plasmide. C'est la raison pour laquelle on préfère transformer des plasmides de petite taille.

Dans les meilleures conditions, les plasmides ne se maintiennent que dans une minorité de la population bactérienne. Pour identifier les bactéries transformées, on utilise des marqueurs de sélection portés par le plasmide. Les marqueurs de sélection les plus utilisés sont les gènes de résistance à des antibiotiques. Par la suite, les bactéries transformées sont cultivées en présence de l'antibiotique de manière à éviter que la bactérie ne perde le plasmide qu'on y a introduit.



Il est crucial de pouvoir distinguer entre les colonies qui contiennent des plasmides recombinants et celles qui contiennent les non recombinants, c.-à-d. entre plasmides qui contiennent l'ADN étranger et plasmides qui se sont refermés sans prendre cet ADN étranger. Lorsqu'un transformant stable a été obtenu, la séquence est dite *clonée*.



Pour être de bons vecteurs de clonage:

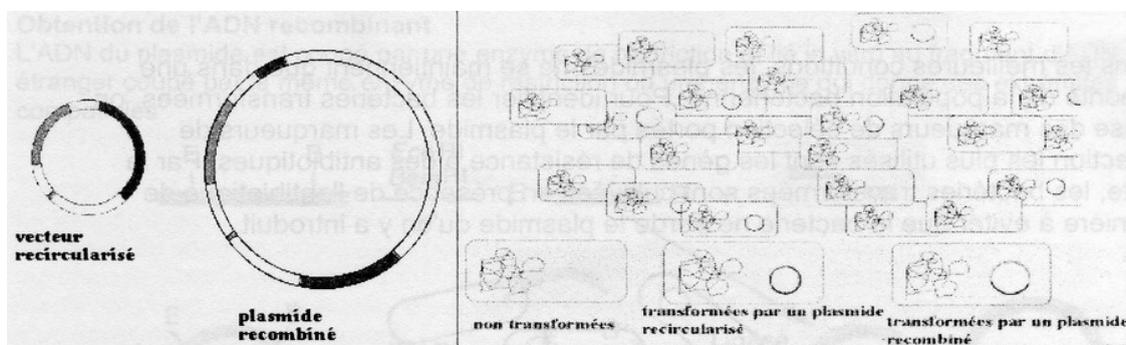
- les plasmides doivent être **petits**
- ils doivent porter des **marqueurs** génétiques particuliers, comme des gènes de résistance aux antibiotiques ou le gène codant la β -galactosidase.
- ils doivent porter un ou plusieurs **sites** de restriction uniques dans une région qui n'est pas essentielle pour la réplication des plasmides
- et si possible, ils doivent avoir des sites de restriction uniques dans des gènes codant des marqueurs sélectifs. Ces marqueurs sont inactivés lorsqu'on y insère un fragment d'ADN étranger.

Insertion dans un gène de résistance

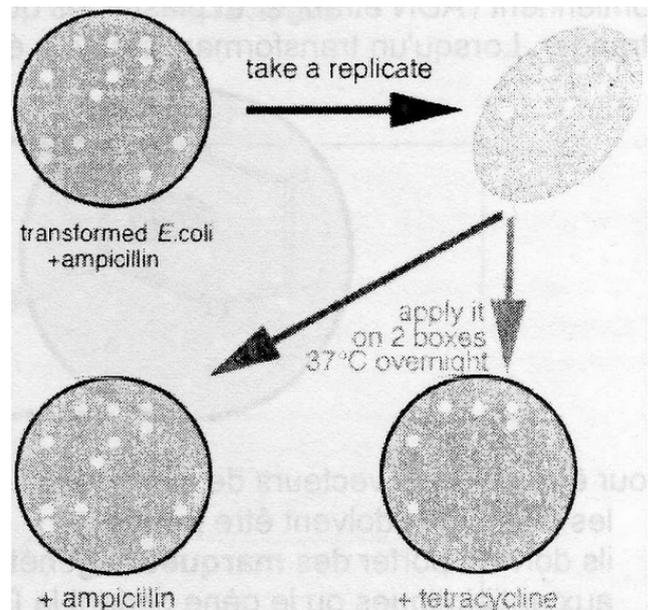
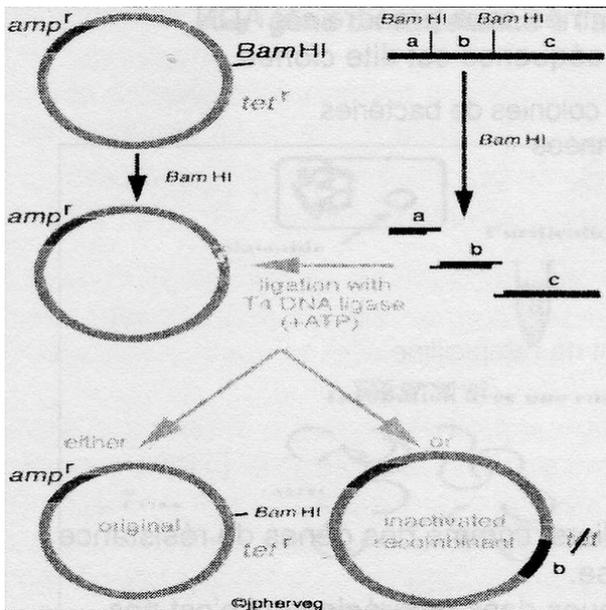
Il est possible de cloner un fragment d'ADN étranger dans un gène de résistance à un antibiotique. Cette méthode ne peut être utilisée qu'avec des vecteurs qui portent au moins 2 gènes de résistance. L'ADN plasmidique est coupé par une enzyme de restriction dont la séquence de reconnaissance est localisée dans un des 2 gènes de résistance, dans ce cas le gène *tetr*. Le vecteur digéré par *BamHI* est ligé à un fragment d'ADN étranger dont les extrémités ont été générées aussi par l'enzyme *BamHI*.

Le mélange de ligation est transformé dans *E. coli*. On sélectionne les transformants résistants au second antibiotique (dans cet exemple, l'ampicilline).

Certaines des colonies qui poussent en présence d'ampicilline vont contenir des plasmides recombinants; d'autres vont contenir le vecteur seul qui s'est recircularisé.



Pour discriminer les 2 types de transformants, on repique chaque colonie sur une boîte contenant de l'ampicilline et sur une boîte contenant de la tétracycline. Les bactéries qui survivent en présence de tétracycline devraient contenir un plasmide non recombinant tandis que les bactéries qui ne poussent pas en présence de tétracycline, mais qui poussent en présence d'ampicilline devraient contenir un plasmide recombinant.



Autre technique de repérage des clones recombinants, par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde marquée correspondant à une séquence du gène d'intérêt :

