



M32

Biologie Moléculaire

Filière SVI- Semestre 5

2014/2015

Pr. Leila MEDRAOUI

OBJECTIFS du MODULE

Acquérir les connaissances de base dans le domaine de la biologie moléculaire

Se familiariser avec les outils méthodologiques modernes en biologie moléculaire

S'initier à déchiffrer une portion d'un génome et de prévoir son expression

Etre en mesure d'envisager les changements de la séquence susceptibles d'influencer l'expression.

Plan du cours

I

- **Initiation aux techniques usuelles de biologie moléculaire**

II

- **Le Dogme Central**

II.1

- **La réplication**

II.2

- **La transcription**
 - Transcription chez les Procaryotes
 - Transcription chez les Eucaryotes

II.3

- **La traduction**

II.4

- **La régulation génétique chez les bactéries**

I. Initiation aux techniques usuelles de biologie moléculaire

1

- **Introduction à la biologie moléculaire**

2

- **Méthodes d'étude des Acides nucléiques (extraction et purification)**

3

- **Séparation des acides nucléiques et électrophorèse**

4

- **Endonucléases de restriction**

5

- **Vecteurs de clonage (plasmides)**

6

- **Marquage des acides nucléiques**

7

- **Amplification par PCR**

1. Introduction à la Biologie Moléculaire

Historique

Au XXe siècle, suite à l'élaboration des lois de la génétique, de la découverte des chromosomes et de l'identification de l'ADN comme support de l'information génétique, est apparue **La biologie moléculaire**.

Au croisement de la génétique, de la biochimie et de la physique, la biologie moléculaire est une discipline scientifique dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire.

1. Introduction à la Biologie Moléculaire

Biologie Moléculaire ?

Etude des gènes portant l'information génétique, leurs transformations et leurs fonctions.

Le terme « biologie moléculaire » désigne également par extension l'ensemble des techniques de manipulations d'acides nucléiques (ADN, ARN), appelées aussi techniques de génie génétique.

1. Introduction à la Biologie Moléculaire

Que faut-il étudier ?

- Les complexes macromoléculaires de l'ADN, de l'ARN et des protéines
- Transfert de l'information: Réplication, Transcription et Traduction

1. Introduction à la Biologie Moléculaire

Quelles sont les conséquences du développement de la biologie moléculaire ?

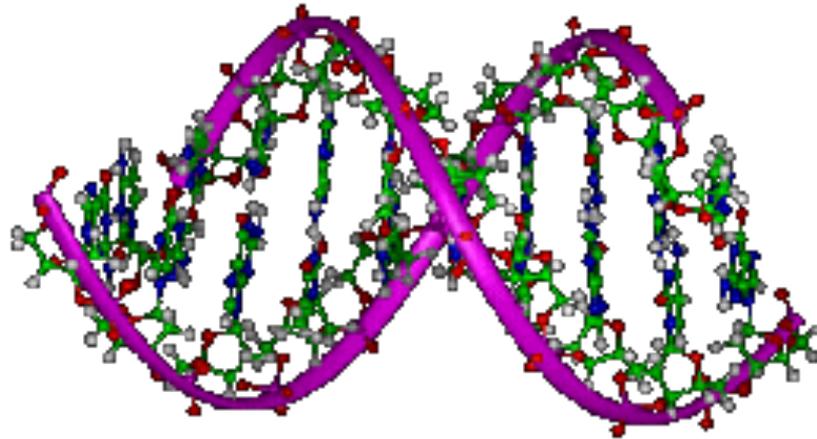
- des connaissances dans le domaine fondamental
- des applications pratiques :
 - production de protéines d'intérêt médical
 - vaccins
 - diagnostic en médecine
 - plantes et animaux transgéniques...

1. Introduction à la Biologie Moléculaire

RAPPELS:

ADN / ARN

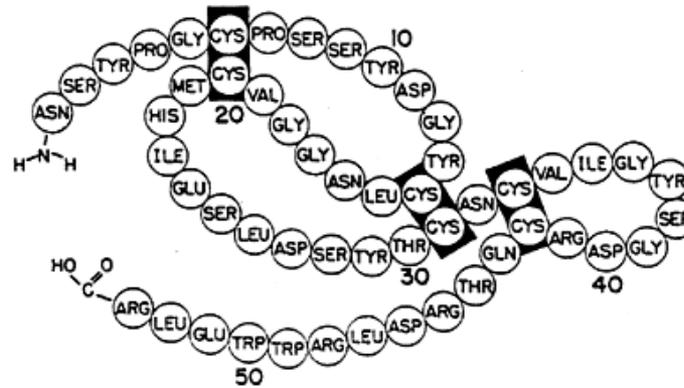
STRUCTURES / FONCTIONS



1. Introduction à la Biologie Moléculaire

RAPPEL

- 50% du poids sec de la plupart des cellules = protéines
- Protéine = polymère (chaîne) d'acides aminés



- Chaque protéine est caractérisée par sa **séquence d'acides aminés**.

Ex. le lysozyme (126 AA)

Lys-Val-Phé-Gly-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Lys-Arg-His-Gly-Leu-Asp
Asn-Tyr-Arg-Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Asn-Trp-Val-Cys-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Ser
Asn-Thr-Gln-Ala-Thr-Asn-Arg-Asn-Thr-Asp-Gly-Ser-Thr-Asp-Tyr-Gly-Ilu-Leu
Gln-Ilu-Asn-Ser-Arg-Trp-Trp-Cys-Asn-Asp-Gly-Arg-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-Asn
Leu-Cys-Asn-Ilu-Pro-Cys-Ser-Ala-Leu-Leu-Ser-Ser-Asp-Ilu-Thr-Ala-Ser-Val
Asn-Cys-Ala-Lys-Lys-Ilu-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-Met-Asn-Ala-Trp-Val-Trp
Arg-Asn-Arg-Cys-Lys-Gly-Thr-Asp-Val-Gln-Ala-Trp-Ilu-Arg-Gly-Cys-Arg-Leu

1. Introduction à la Biologie Moléculaire

RAPPEL

- ✓ On connaît actuellement ~ 8000 protéines différentes.
- ✓ On en découvre une centaine de nouvelles par mois.
- ✓ Nombre total de protéines que peut fabriquer l'organisme humain = ??? (quelque chose entre 50 000 et 150 000).
- ✓ Chaque cellule fabrique les protéines dont elle a besoin.
- ✓ Pour fabriquer une protéine, il faut deux choses:
 - Des acides aminés.
 - La « recette » : quels acides aminés faut-il assembler et dans quel ordre ?

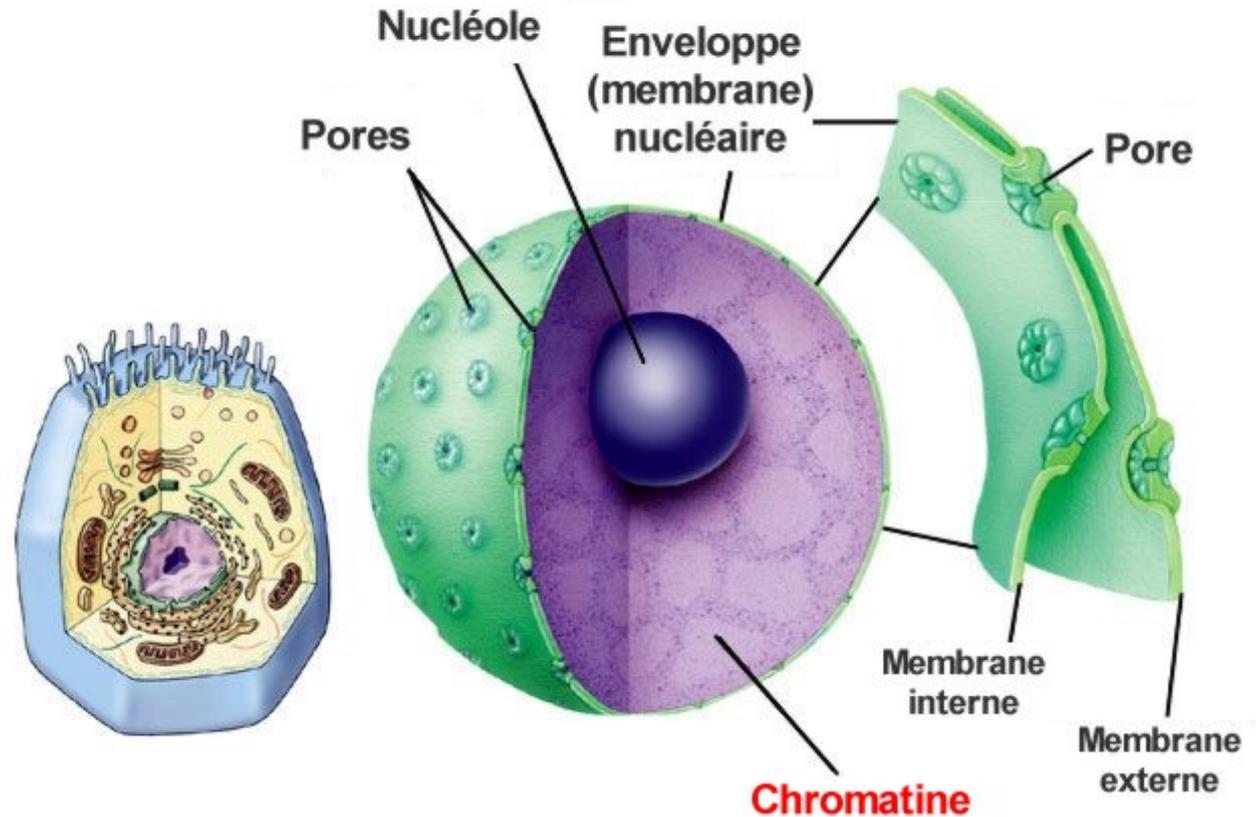
1. Introduction à la Biologie Moléculaire

RAPPEL

© The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

« Recettes »
contenues
dans le **noyau**

Noyau contient
une matière
appelée
chromatine



Chromatine = protéines appelées *histones* et l'ADN

ADN = « recettes » des protéines

1. Introduction à la Biologie Moléculaire

RAPPEL

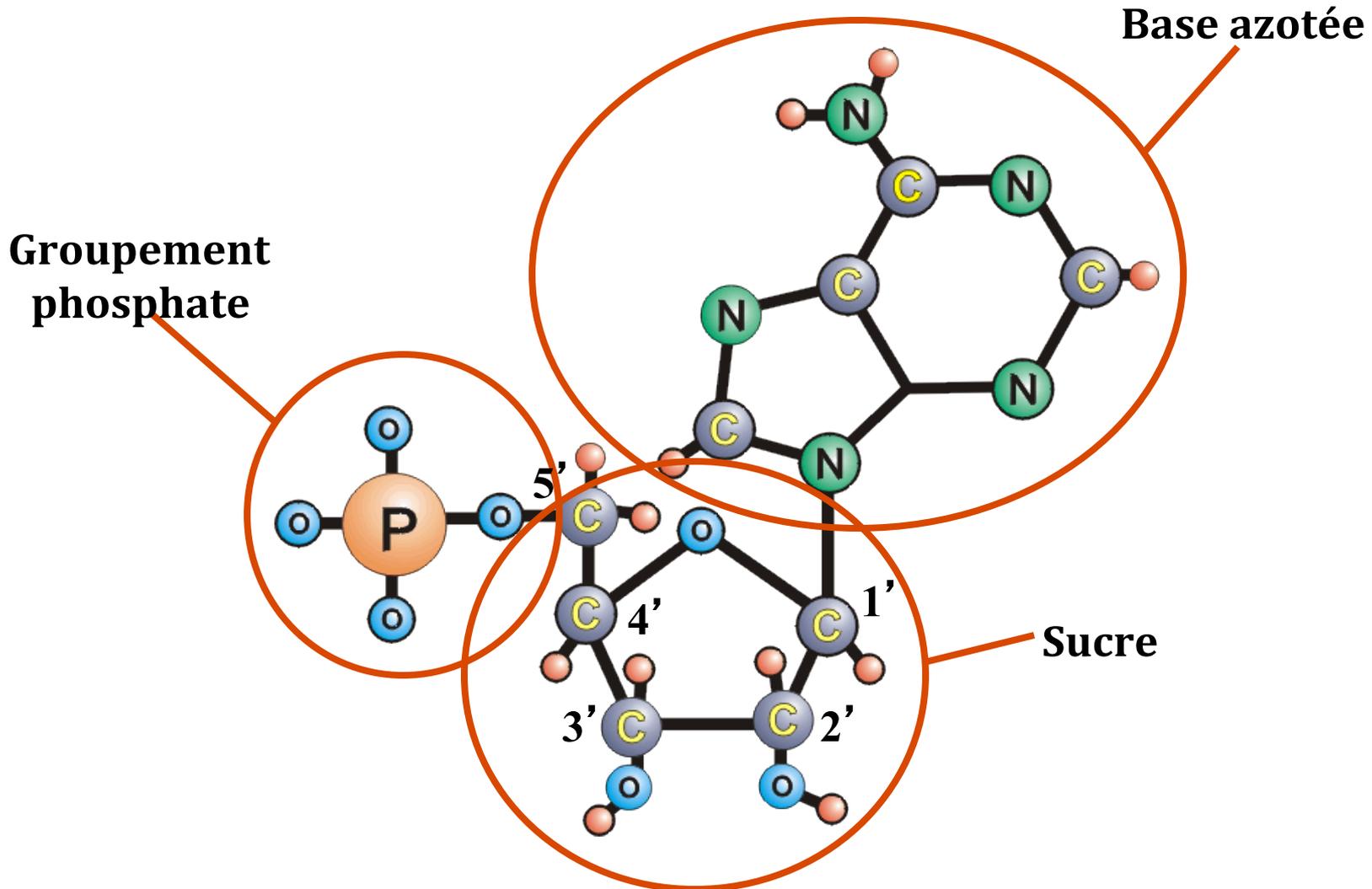
- ✓ Crick et Watson, 1953
- ✓ Découverte de la structure de la molécule d'ADN
- ✓ ADN et ARN = acides nucléiques
- ✓ Les acides nucléiques = polymères de nucléotides



1. Introduction à la Biologie Moléculaire

RAPPEL

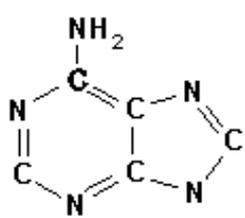
- ✓ NUCLÉOTIDE = ose + base azotée + acide phosphorique



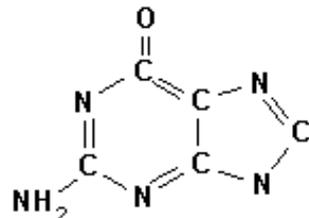
1. Introduction à la Biologie Moléculaire

RAPPEL

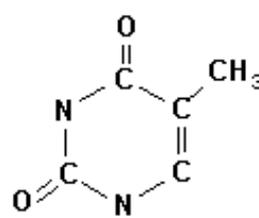
- ✓ Les bases azotées : puriques ou pyrimidiques



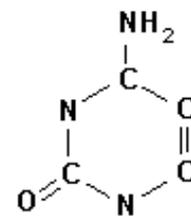
Adénine



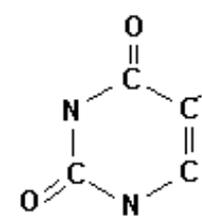
Guanine



Thymine



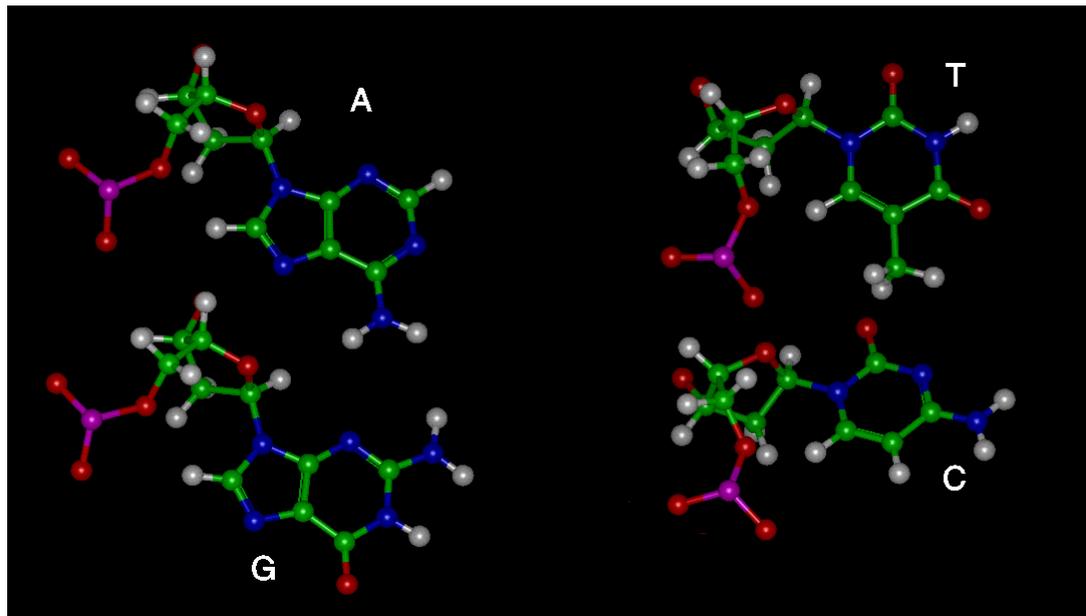
Cytosine



Uracile

Purines

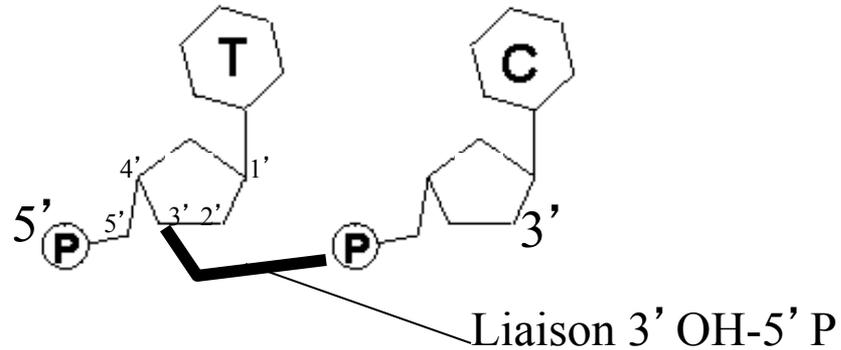
Pyrimidines



1. Introduction à la Biologie Moléculaire

ADN : structure

- ✓ ADN = Acide DésoxyriboNucléique
- ✓ Polymères de nucléotides reliés entre eux par des fonctions esters

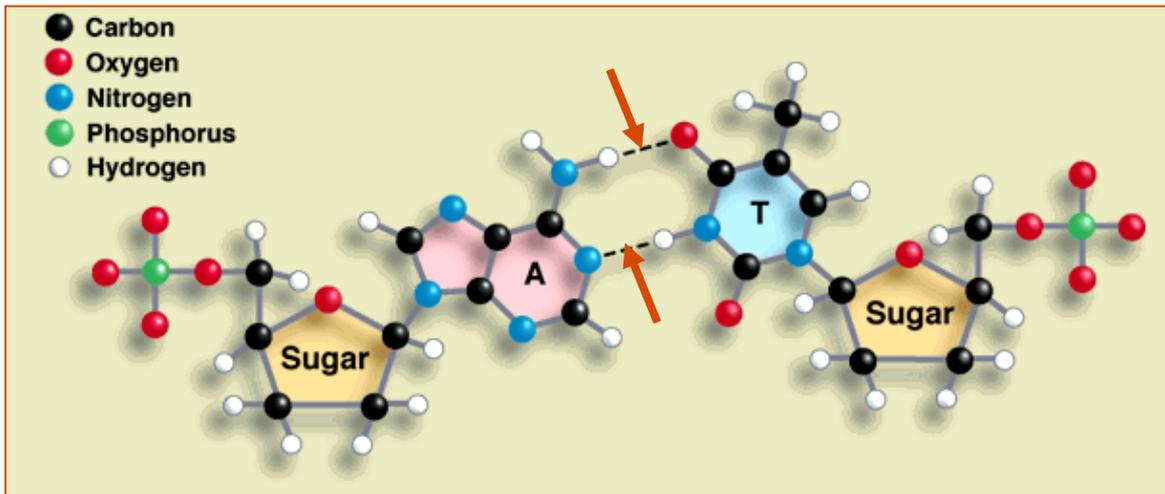


- ✓ Ose = désoxyribose
- ✓ Les bases : Adénine, Guanine, Cytosine et Thymine
- ✓ Si on sépare une molécule d'ADN en nucléotides, on obtient toujours : A=T et G=C
- ✓ Pourquoi ?

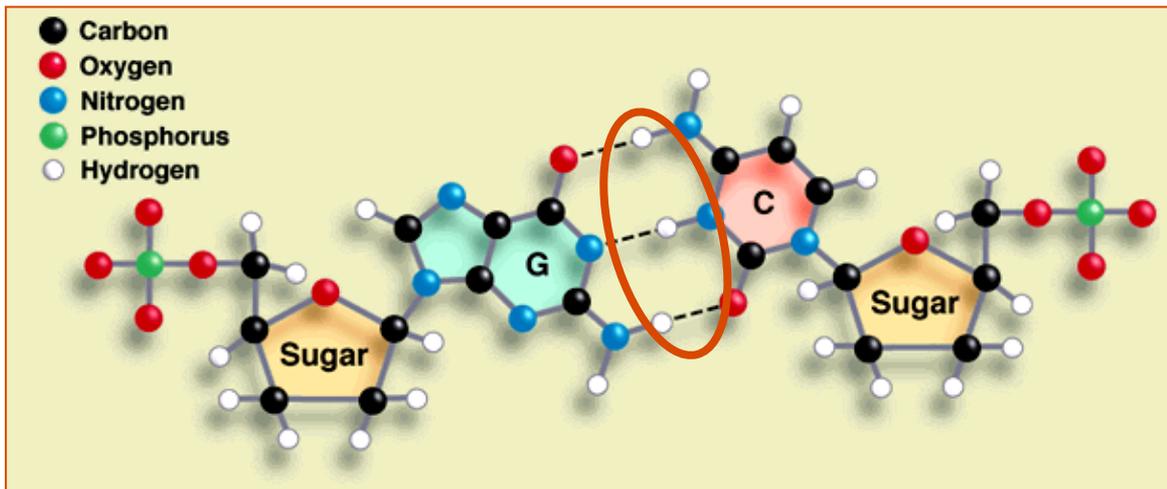
1. Introduction à la Biologie Moléculaire

ADN : structure

✓ Hypothèse de Crick et Watson : A peut s'apparier avec T et C avec G



A avec **T** :
deux liaisons
hydrogène



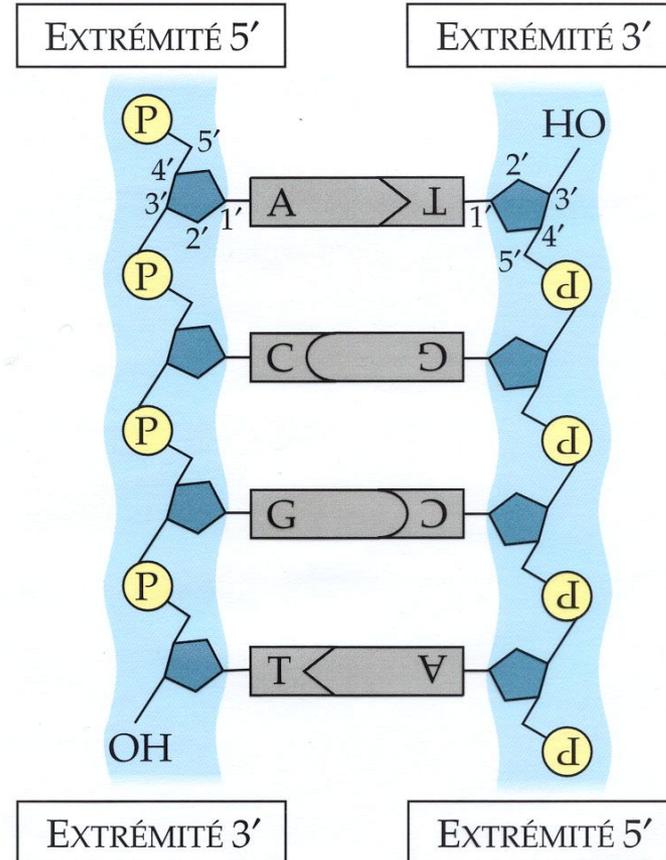
C avec **G** :
trois liaisons
hydrogène

1. Introduction à la Biologie Moléculaire

ADN : structure

- Donc la molécule d'ADN est formée de 2 brins de nucléotides
- Ces deux brins ont trois propriétés essentielles :

- antiparallèles
- complémentaires
- hélicoïdaux



1. Introduction à la Biologie Moléculaire

ADN des différents être vivants

- ✓ Dans tous les organismes :
 - Support de l'information génétique
 - Structure en double hélice (sauf certains virus)

- ✓ Différences :
 - Nombre de molécules d'ADN : 1 pour E. Coli et 46 pour l'Homme
 - Longueur : quelques milliers de nucléotides à plusieurs millions
 - Forme : linéaire ou circulaire
 - Localisation dans la cellule : séparé ou non du cytoplasme par une membrane
 - Séquence en bases

- ✓ **Virus** : génomes les plus petits (quelques milliers de nucléotides) à ADN ou à ARN

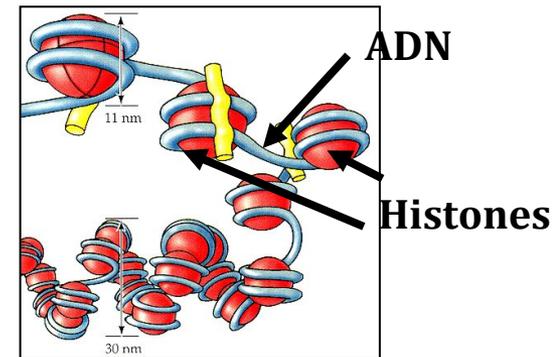
1. Introduction à la Biologie Moléculaire

ADN des différents être vivants

- ✓ **Procaryotes** : ADN dans le cytoplasme
Un seul chromosome « circulaire » = continu
Plusieurs millions de nucléotides
Présence de plasmides = petits morceaux d'ADN circulaires, indépendants de l'ADN principal

- ✓ **Eucaryotes** : ADN dans le noyau
Plusieurs chromosomes avec ADN fortement compacté et linéaire
Plusieurs milliards de nucléotides
ADN associé à des protéines

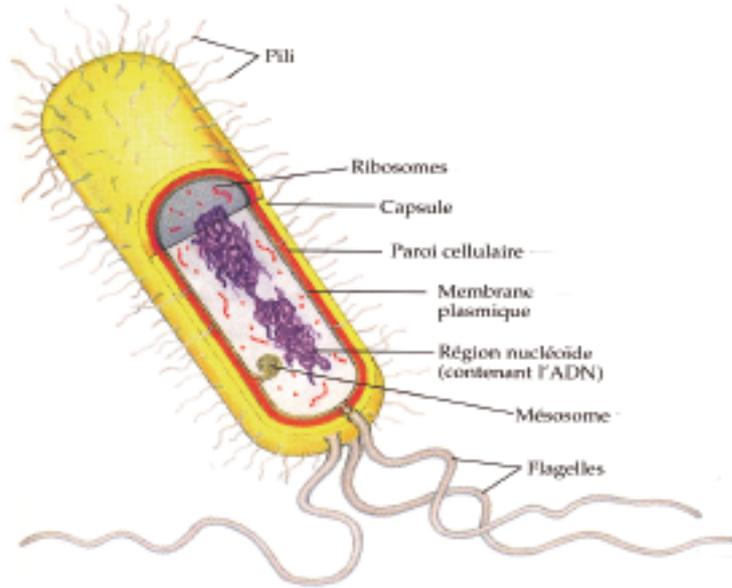
- ✓ **Cas de l'ADN des mitochondries** :
ADN circulaire
Code génétique différent de l'ADN nucléaire
Transmission maternelle uniquement



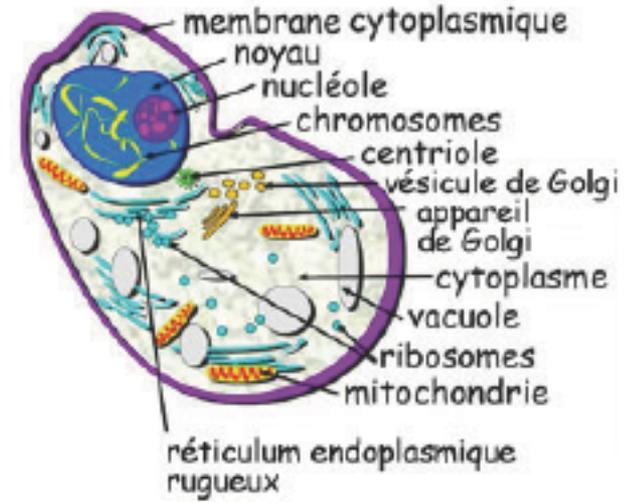
1. Introduction à la Biologie Moléculaire

RAPPEL

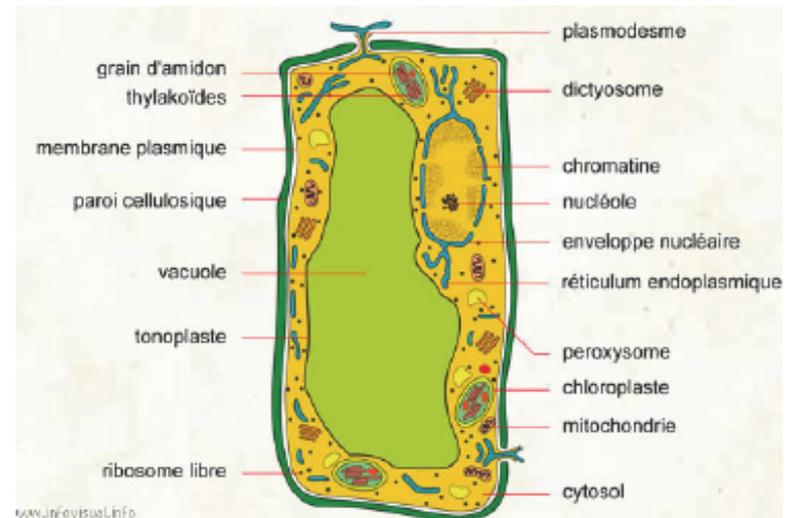
Procaryote/Eucaryote



Bactérie



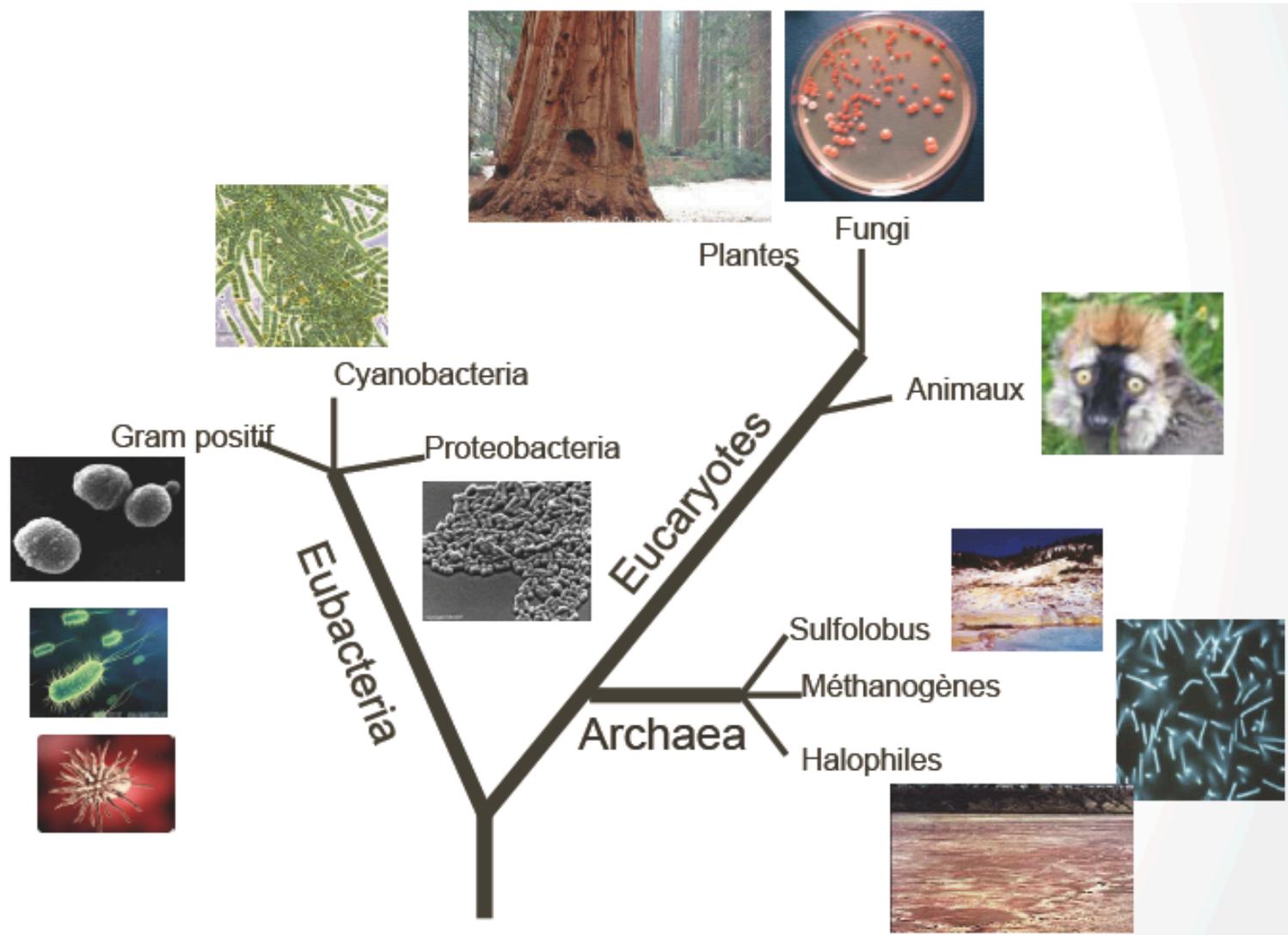
Cellule animale



Cellule végétale

1. Introduction à la Biologie Moléculaire

Les 3 domaines du vivant

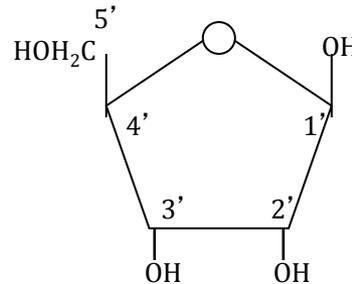


1. Introduction à la Biologie Moléculaire

ARN : structure

- ARN = Acide RiboNucléique
- Polymères de nucléotides reliés entre eux par des fonctions esters

- Ose = ribose



Ribose

- Les bases : Adénine, Guanine, Cytosine et Uracile
- ARN = un seul brin
- Appariement entre 2 ARN différents, entre un brin d'ADN et un brin d'ARN ou sur lui même : A avec U et G avec C

1. Introduction à la Biologie Moléculaire

Les différents ARNs :

- ARNr = ARN ribosomique
Participent, avec les protéines ribosomiques, à la formation des ribosomes (molécules nécessaires à la synthèse des protéines)
- ARNt = ARN de transfert
Transfert les acides aminés vers le lieu de synthèse des protéines
- ARNm = ARN messagers
Portent l'information génétique de l'ADN vers le lieu de synthèse des protéines
- ARNsn=ARN small nuclear
Présent dans le noyau uniquement
Participent à la régulation post-transcriptionnelle

1

- Introduction à la biologie moléculaire

2

- *Méthodes d'étude des Acides nucléiques (extraction et purification)*

3

- Séparation des acides nucléiques et électrophorèse

4

- Endonucléases de restriction

5

- Vecteurs de clonage (plasmides)

6

- Marquage des acides nucléiques

7

- Amplification par PCR

2. Méthodes d'étude des Acides nucléiques (extraction et purification)

OBJECTIFS

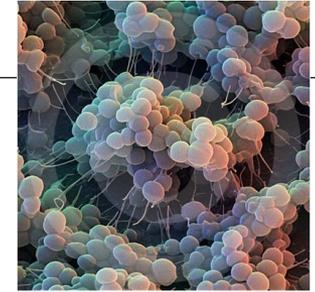
Décrire les gestes qui permettent de réaliser l'extraction et la purification d'ADN génomique.

Faire la distinction entre les démarches à suivre en fonction des types d'organismes .

Expliquer le principe de l'extraction de l'ARN messager en vue de la réalisation d'une banque d'ADNc.

Expliquer le principe de dosage des acides nucléiques et le calcul des quantités d'acides nucléiques à partir des données brutes fournies par un spectrophotomètre.

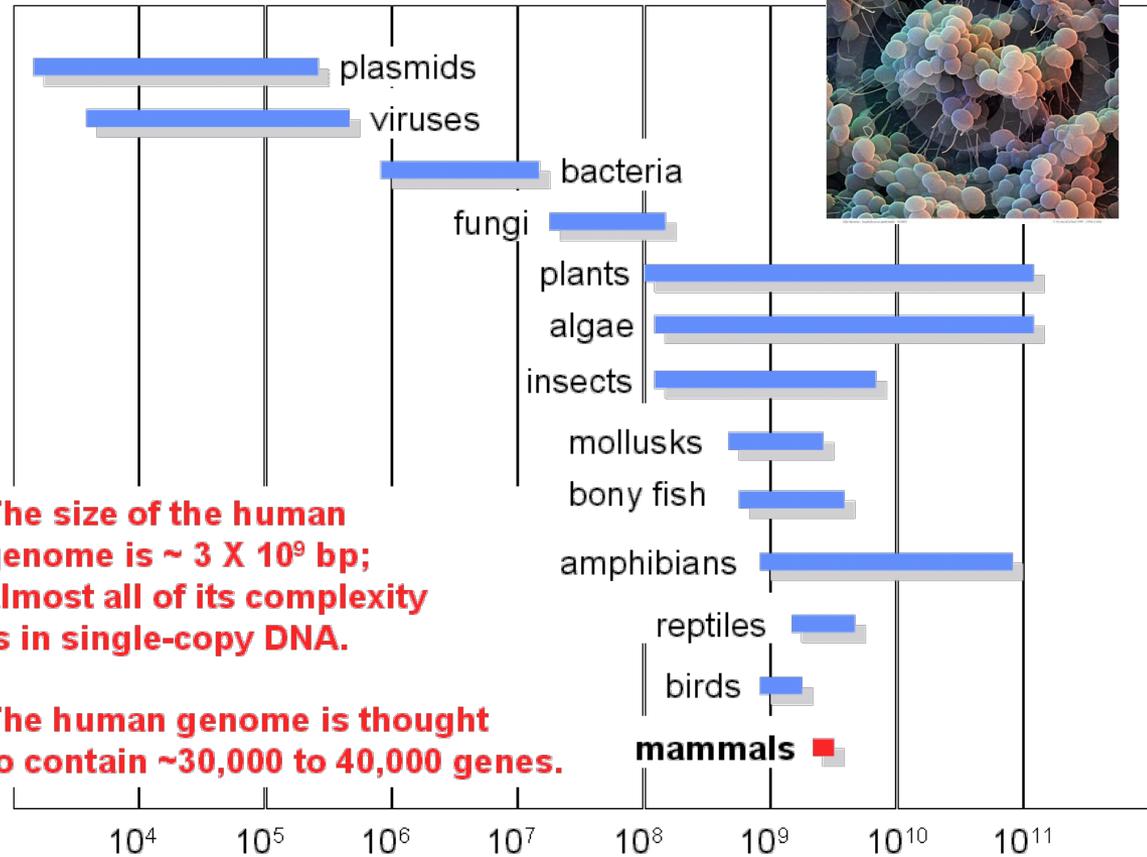
2.1.Extraction de l'ADN



Différents ADN

ADN génomique
La totalité de l'ADN à l'intérieur du noyau
=ADN nucléaire
=ADN chromosomique

Différent d' :
ADN Mitochondrial
ADN Chloroplastique
ADN Extra-chromosomique (plasmides)



2.1.Extraction de l'ADN

2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

=technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus.

L'ADN extrait → digestion, hybridation (Southern blot), séquençage, PCR, clonage...

Différents protocoles pour extraire l'ADN avec même schéma de principe :

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN...)
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

2.1.Extraction de l'ADN

2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

Différentes variantes employées:

L' **ADN génomique** est issu de tissu (organisme animal ou végétal) Ou de cellules (micro-organisme, fluides biologiques...)

Plusieurs techniques sont utilisées:

Phénol/Chloroforme → ADN pur

Kits commerciaux → extractions rapides à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

Préparation du matériel pour l'extraction

CAS 1: à partir de matière fraîche

FEUILLES FRAICHES



2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

Préparation du matériel pour l' extraction

CAS 2: à partir de matière sèche

FEUILLES LYOPHILISEES



2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

Préparation d'ADN génomique

lyse des cellules ou des tissus

=broyage ou pas + extraction/détergents

- disperser les bicouches lipidiques des membranes
- dénaturer les protéines srtt celles associées à l'ADN dans la chromatine

Solution très visqueuse

l'ADN : très longs filaments s'opposant aux écoulements hydrodynamiques.

déprotéinisation de la solution

=extraction / solvants organiques, en général du phénol +/-chloroforme

protéines dénaturées → précipité à l'interface phénol-eau = « gâteau »
l'ADN en solution dans la phase aqueuse

précipitation de l' ADN

=addition d'éthanol ou d'isopropanol dans la phase aqueuse

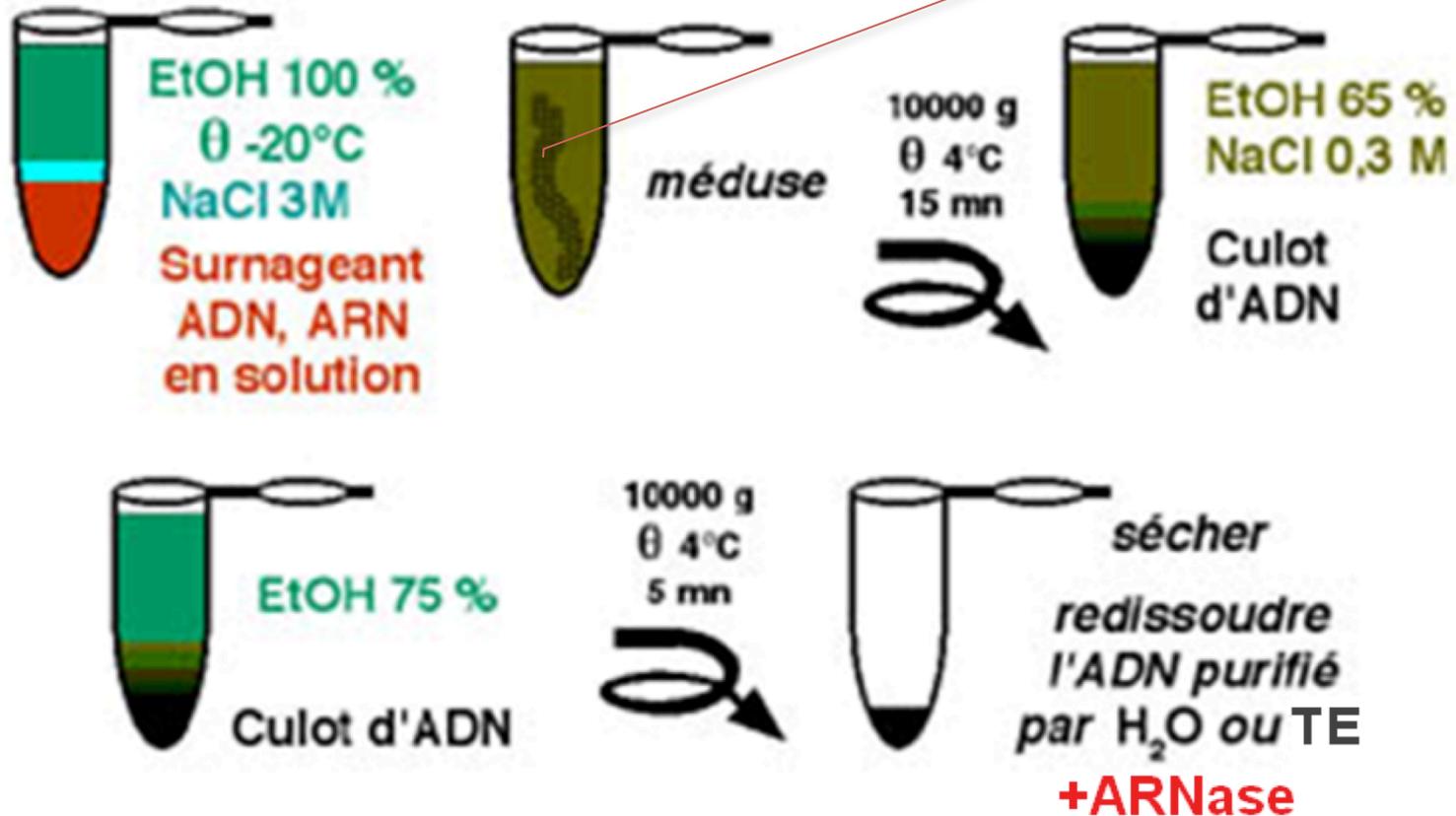
L' ADN collecté/centrifugation
→ dissous dans Tampon ou Eau pure.

Pour éliminer les ARNs → Traitement par l' **ARNase**.

2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

Ethanol mobilise l'eau du milieu & diminue la solubilité de l'ADN

Purification de l'ADN



Pour éliminer les traces de phénol et d'autres contaminants (prot., enz...) → dialyse ou purification par chromatographie en colonne de gel dénaturant ou d'adsorption.

Commentaire :

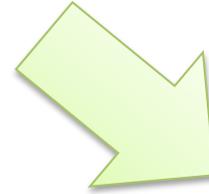
La purification d'une solution d'ADN se fait le plus souvent par précipitations répétées dans l'alcool.

Une solution d'ADN, portée à haute force ionique par addition de NaCl 3 M (1/10 du volume), est additionnée d'un large excès d'éthanol absolu à -20°C. Au bout de quelques minutes au maximum, on voit apparaître un précipité blanchâtre, translucide et filamenteux (la « méduse ») constitué de longs filaments d'ADN précipité.

On recueille ce précipité par centrifugation à 10000 g pendant un quart d'heure environ. Pour laver l'ADN on resuspend le précipité dans de l'éthanol à 75 % toujours à -20°C. puis on centrifuge à nouveau. Le culot de cette dernière centrifugation est égoutté, puis séché sous vide.

On peut conserver l'ADN à sec ou le redissoudre immédiatement soit dans de l'eau pure stérile, soit dans un tampon Tris-EDTA.

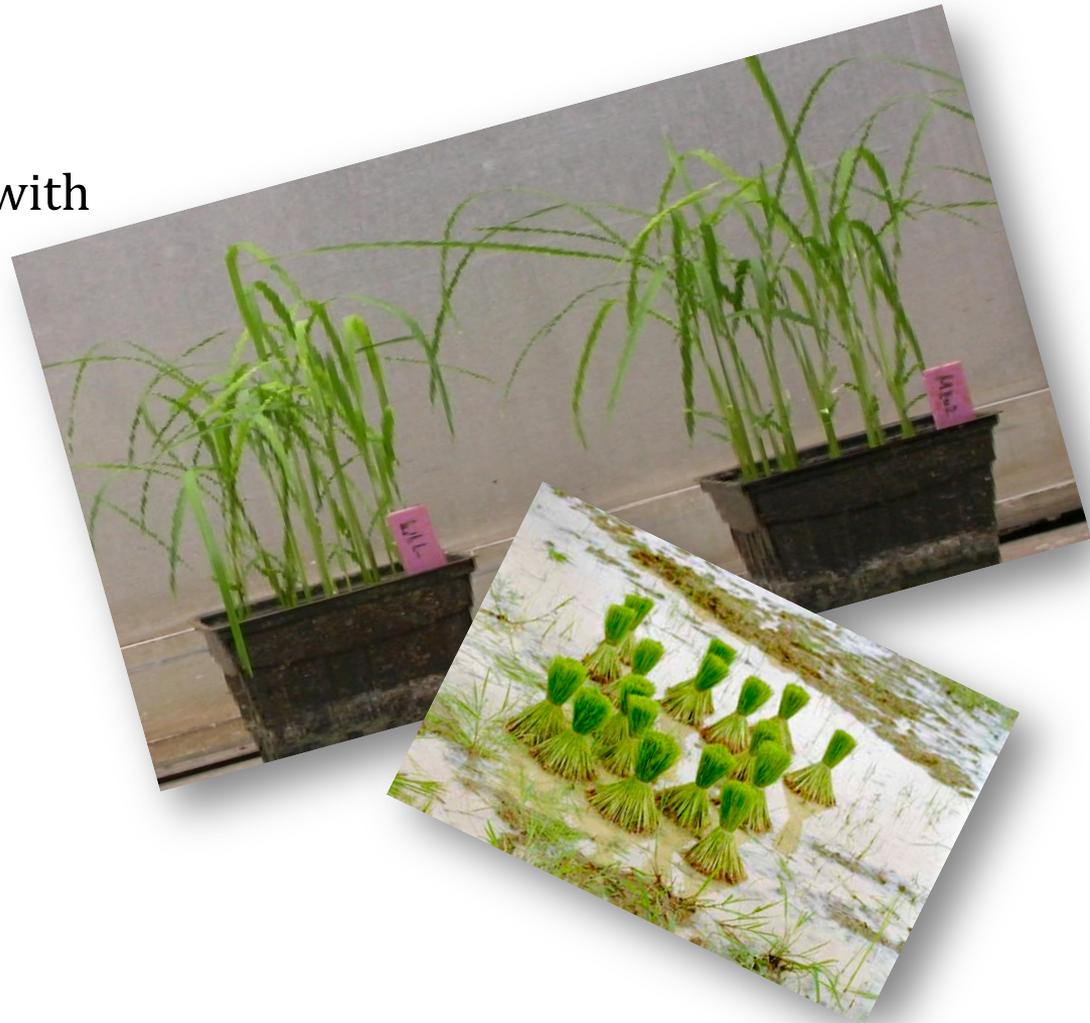
2.1.1. Extraction de l'ADN génomique



2.1.1. Extraction de l'ADN génomique Exemple 1

GENOMIC DNA ISOLATION FROM RICE SEEDLINGS

- DNA extraction buffer
 - Cell wall and cell membranes' disruption with SDS/Mercaptoethanol
- Protein denaturation
 - Chloroform/ phenol
- DNA precipitation
 - Absolute Ethanol
- Washing
 - 70% Ethanol
- DNA renaturation
 - TE buffer

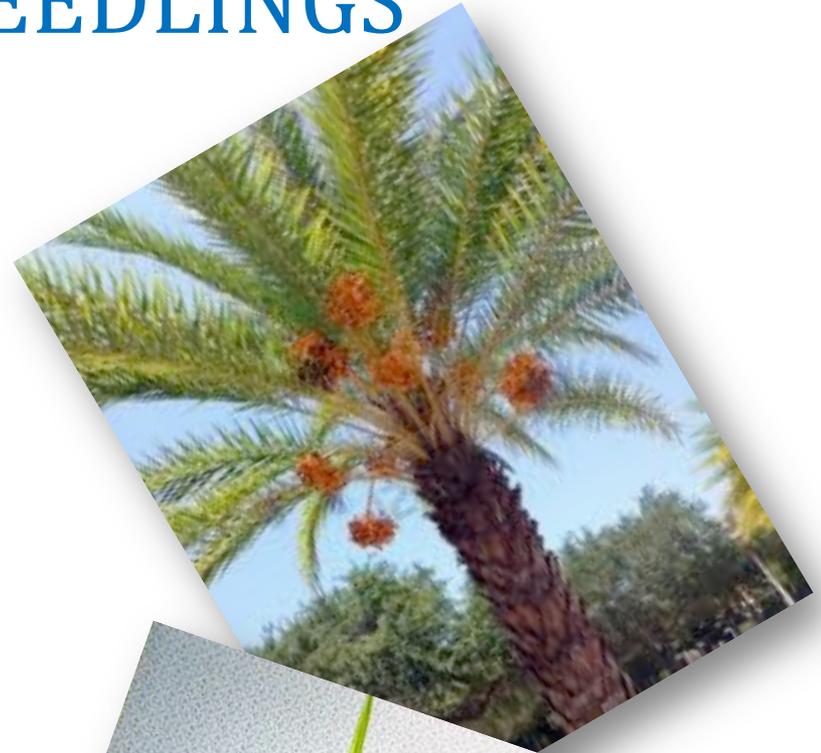


2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

Exemple 2

GENOMIC DNA ISOLATION FROM DATE PALM SEEDLINGS

- DNA extraction buffer
 - Cell wall and cell membranes' disruption with CATB & PVPP
- Protein denaturation
 - Dichloromethane
- DNA precipitation
 - Absolute Isopropanol
- Washing
 - 70% alcohol
- DNA renaturation
 - TE buffer



2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

Comparaison de différentes méthodes: méthode classique *versus* kits commerciaux

	Phénol/ Chloroforme	Kit Puregene	Kit Qiagen
Quantité/ Rendement	2	3	1
Pureté de l' extrait	3	1	2
Rapidité	1	2	3
Coût	3	2	1
Sécurité du manipulateur	1	3	3

1= la moins bonne; 3= la meilleure.

2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

RECAPITULATIF

L' extraction/purification de l'ADN = 2 Etapes:

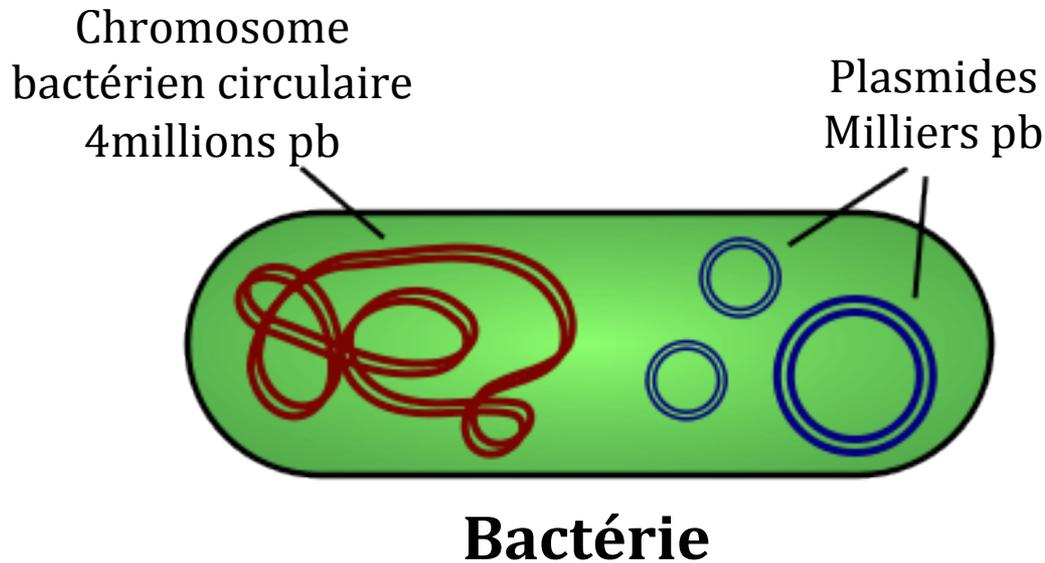
Extraction → digestion des tissus et lyse des cellules

Purification → séparation de l' ADN des autres constituants cellulaires.

2.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique

Les plasmides: Généralités

- ✓ Petites molécules d'ADN double brin, habituellement circulaires
- ✓ A localisation extrachromosomique
- ✓ Présents chez la plupart des espèces bactériennes (qqes levures et mycètes)



2.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique

Les plasmides: Généralités

- ✓ A répllication autonome (=réplicons) indépendamment des chromosomes
- ✓ A taille très variable (1Kb à 1 Mb)
- ✓ Portent un nombre de gènes très réduit (≤ 30)
- ✓ A information génétique non-essentielle pour l'hôte mais procurant un avantage sélectif
- ✓ En nbr. variable:

Plasmide à copie unique
(1 à 3/cellule hôte)

**Plasmide Stringent →
Réplication stringente**

Plasmides à copies multiples
(20 à 2000/cellule hôte)

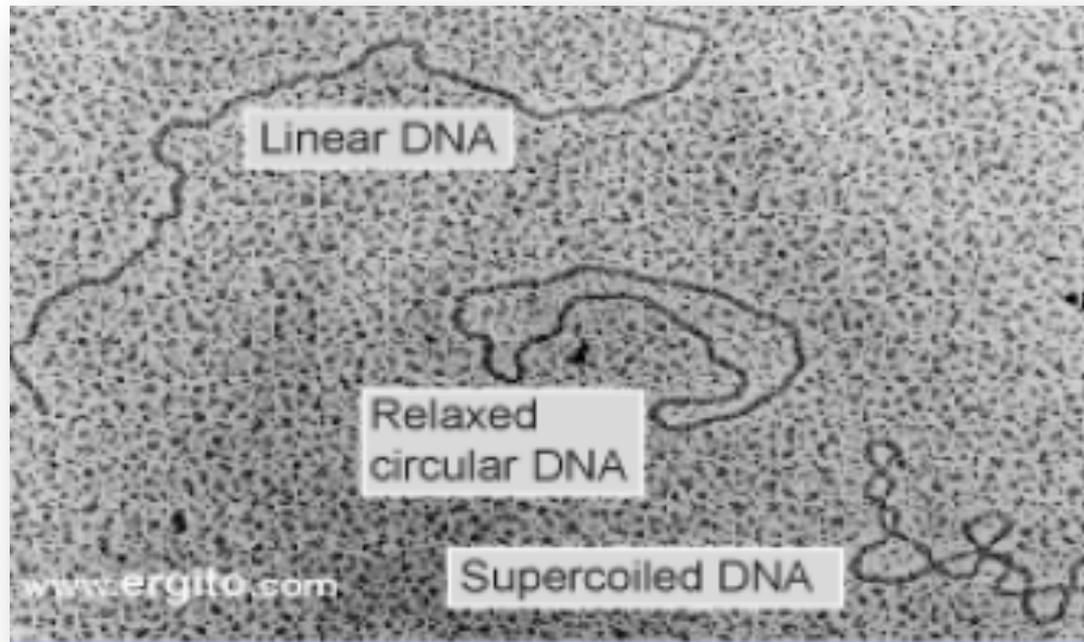
**Plasmide relâché →
Réplication relâchée**

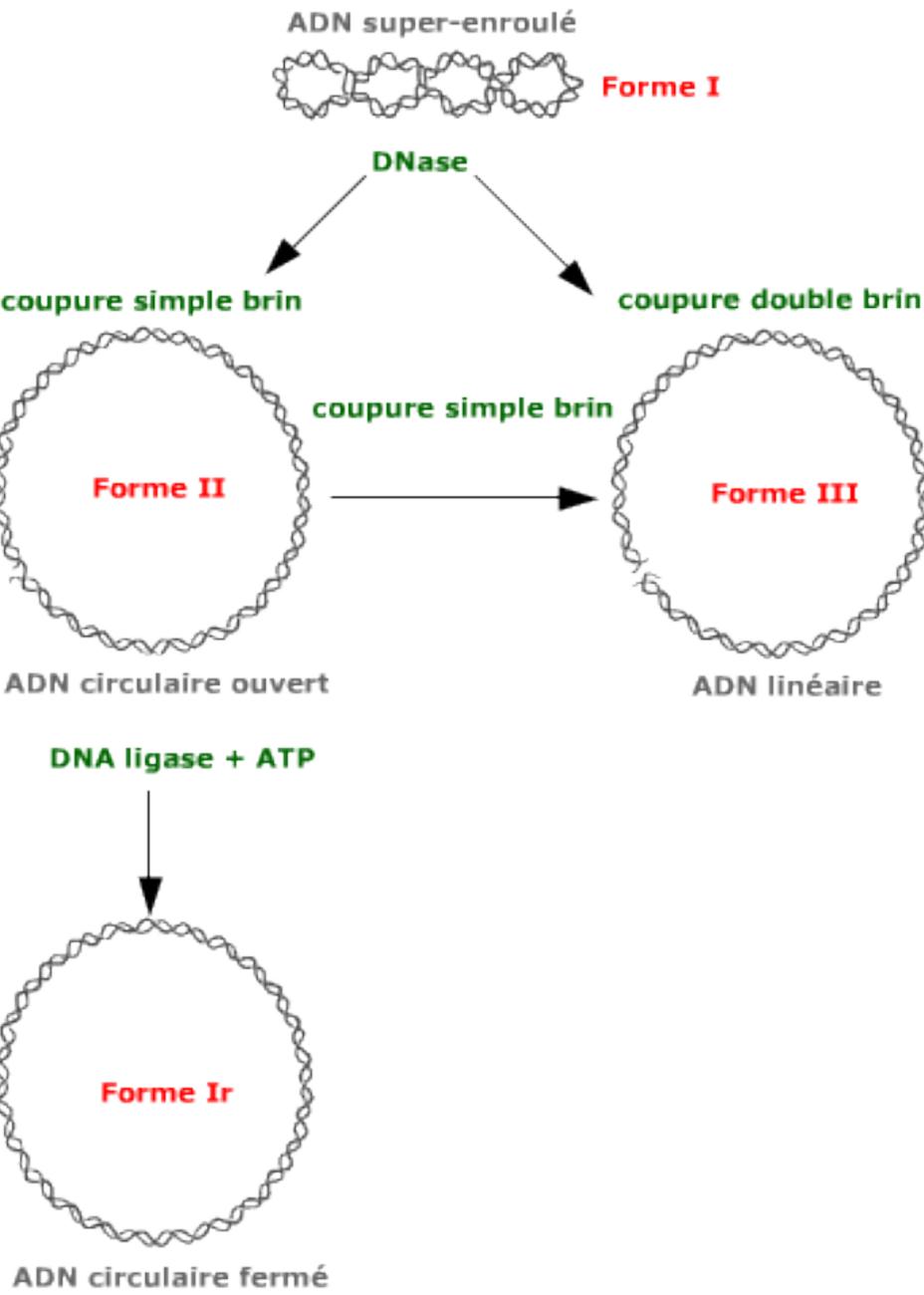
2.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique

Les plasmides: Généralités

ADN double brin Superhélicale avec 3 formes:

- Confèrent à la bactérie-hôte une grande souplesse génétique.
- Augmentent son patrimoine génétique.
- Procure un avantage sélectif.





Différentes formes d'un plasmide

L'axe de la double hélice d'ADN peut lui-même s'enrouler en une superhélice droite ou gauche. Cette forme **superenroulée** de l'ADN joue un rôle biologique très important (**compaction, stabilité de l'ADN**).

Une coupure sur un seul des deux brins d'ADN superenroulé (forme I) déverrouille la superhélicité et permet le relâchement spontané de la molécule sous forme **circulaire ouverte** (forme II).

La réparation de cette coupure par une ligase produit une forme **circulaire fermée** (forme Ir).

Une coupure sur les deux brins d'une molécule superenroulée ou d'une molécule circulaire fermée produit une **molécule linéaire** (forme III).

2.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique

Les plasmides: Généralités

Les plasmides peuvent être éliminés des cellules hôtes=CURAGE (curing)

➤ Spontané/Induit

➤ **Principe**: traitements inhibant la réplication des plasmides sans affecter la reproduction des cellules hôtes → Plasmides inhibés progressivement & dilués au cours de la multiplication bactérienne

Méthodes de curage:

- Mutagènes dérivés de l'acridine
- Radiations UV ou ionisantes
- Privation de thymine
- Températures supra-optimales

2.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique

Purification des plasmides: La lyse alcaline

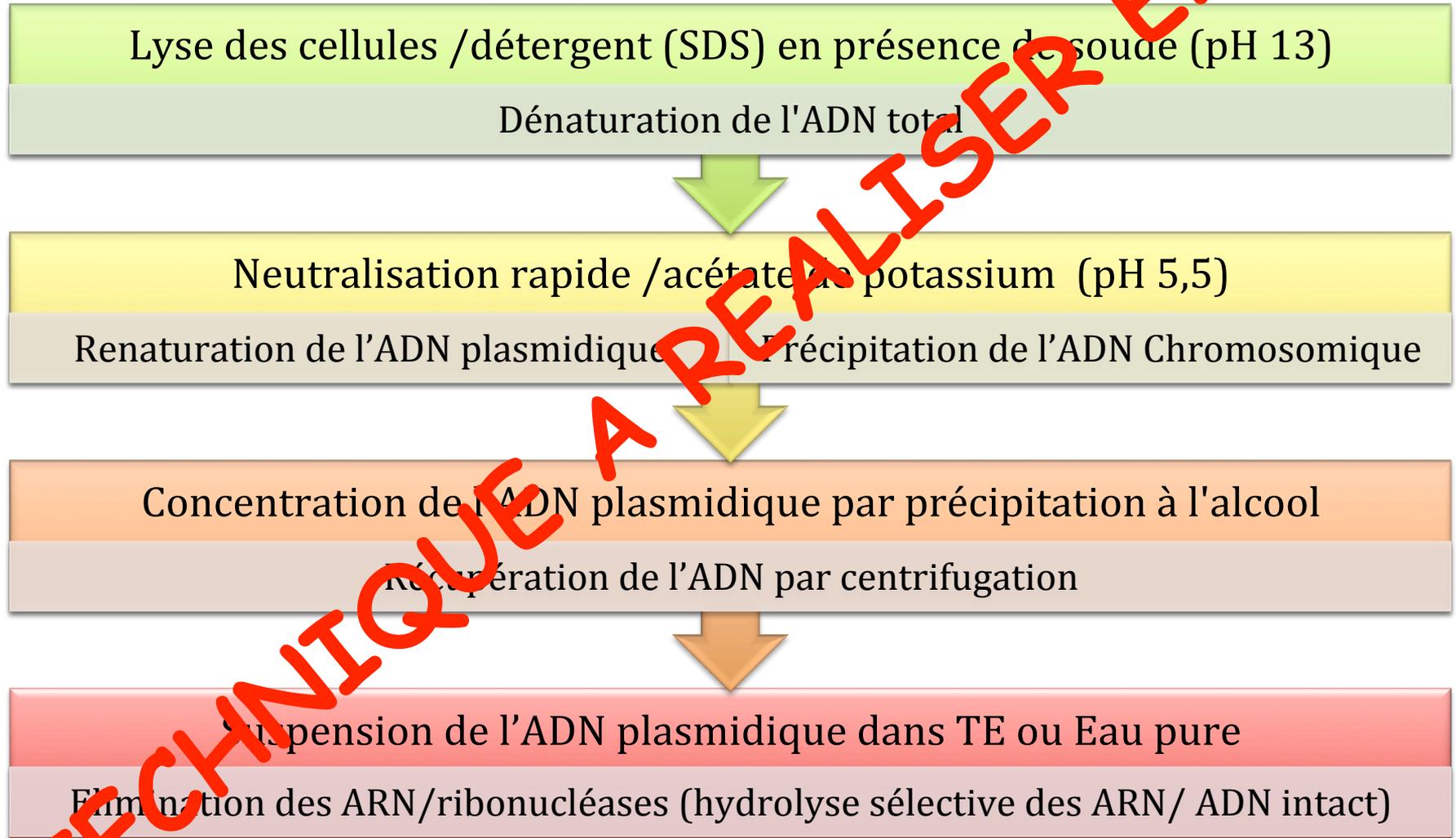
- ✓ Parmi les techniques les plus courantes de la biologie moléculaire = noms abrégés: **miniprep**, **midiprep** et **maxiprep** (volume de la culture bactérienne).

BUT : Extraire de façon rapide l'ADN plasmidique afin de l'analyser avec des enzymes de restriction et électrophorèse en gel d'agarose. Obtenir plusieurs mg d'ADN partiellement purifié et Réaliser plusieurs digestions enzymatiques pour vérifier un clone, ou établir une carte de restriction.

- ✓ Préparation sélective de l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien.
- ✓ Différentes variantes ou améliorations de cette méthode existent
- ✓ kits commerciaux (grd nbr) avec petites colonnes de résine chromatographique échangeuse d'ion → améliorer la pureté de l'ADN₄₅

2.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique

Purification des plasmides: La lyse alcaline



TECHNIQUE A REALISER EN TP

2.2.Extraction de l'ARN

=technique permettant d'isoler l'ARN de cellules ou de tissus.

L'ARN extrait → hybridation (Northern blot), banques ADNc, RT-PCR...

Différents protocoles pour extraire l'ARN avec même schéma de principe :

⊗ Lyse cellulaire mécanique (congélation, billes de céramique ou détergents) ou enzymatique (lysozyme ou la lyticase)+Protection des

ARN de l'action des ARNases.

⊗ 2 grands principes:

- 1) les différences de propriétés physico-chimiques ARN/protéines ;
- 2) l'adsorption sélective des ARN sur support solide.

2.2.Extraction de l'ARN

Inhibition des RNases au cours de l'extraction des ARNs

Le **pyrocarbonate d'éthyle** ou **diéthyl pyrocarbonate**, diéthyl dicarbonate, DEPC, est un composé organique utilisé en biochimie pour sa capacité à réagir spécifiquement avec les acides aminés histidine et, dans une moindre mesure, tyrosine des protéines.

Utilisation en Extraction des ARN

Cette particularité permet d'utiliser cette molécule pour inactiver les RNases. Ces protéines sont en effet très résistantes aux agents dénaturants. La réaction avec le DEPC modifie les histidines du site actif de ces enzymes.

L'inactivation des RNases est recommandée au cours d'expériences mettant en jeu des ARNs afin d'éviter leur dégradation.

2.2.Extraction de l'ARN

Au laboratoire

- La vaisselle de laboratoire peut être décontaminée par trempage dans une solution à 1% de DEPC pendant environ une heure.
- L'eau utilisée pour faire les diverses solutions en contact avec les ARN est aussi traitée avec le DEPC. On obtient ainsi de l'eau sans RNases.
- Le DEPC n'ayant pas réagi est dégradé en éthanol et dioxyde de carbone par une courte phase de chauffage sous pression à 120 °C dans une autoclave.

Ce produit est considéré comme mutagène
→A manipuler avec précaution ...

2.2.Extraction de l'ARN

Extraction des ARN totaux

Broyage/Homogénéisation

Trizol (pH 5)

Séparation de l'ARN

Chloroforme

Précipitation de l'ARN

Ethanol Absolu froids ...

Suspension de l'ARN

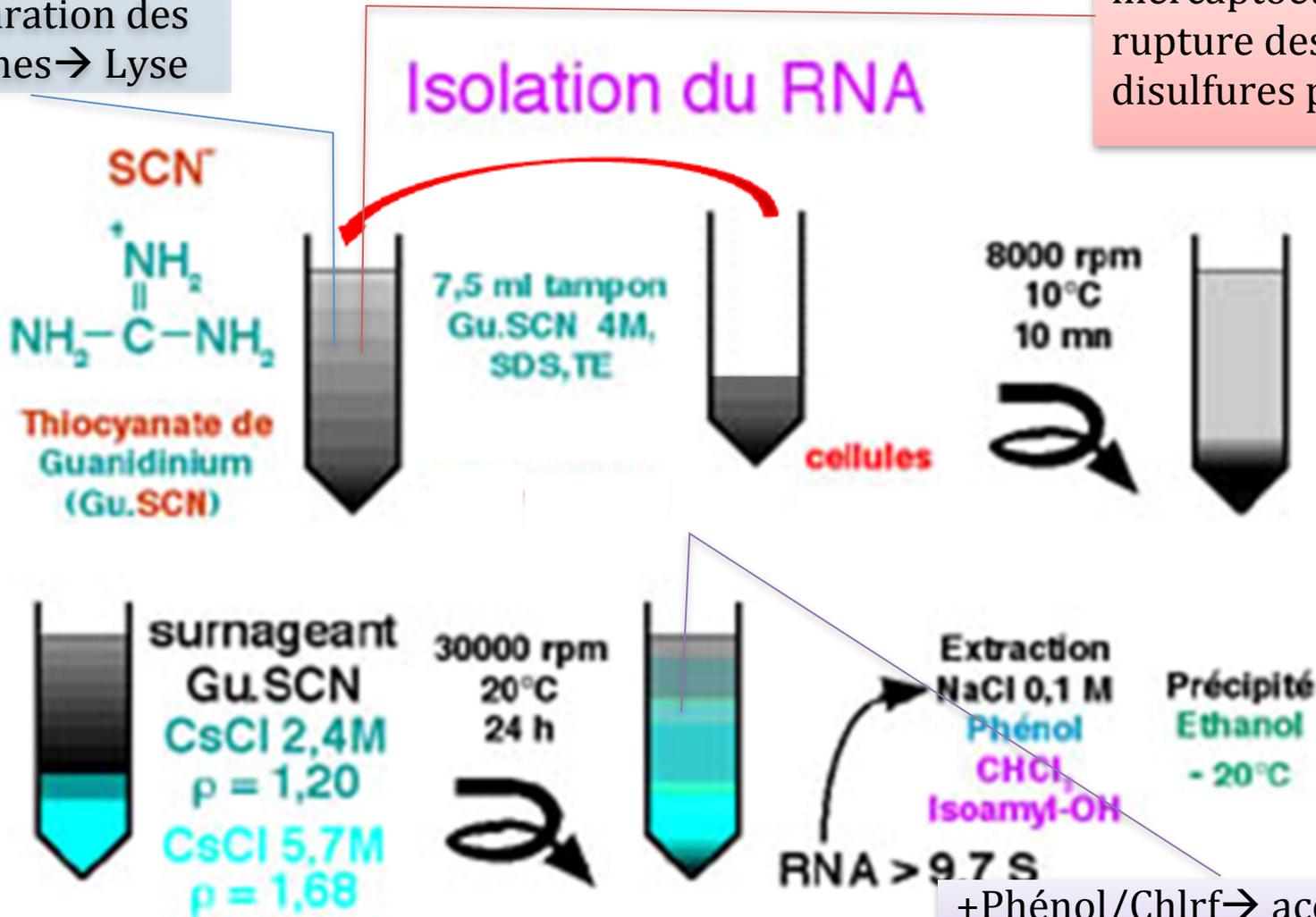
Eau pure (RNase free)

2.2.Extraction de l'ARN

Extraction des ARN totaux

GuSCN: agent puissant de dénaturation des protéines → Lyse

beta2-mercaptoéthanol → rupture des ponts disulfures protéiques



+Phénol/Chlrf → accélérer la procédure d'extraction

Pour extraire l'ARN d'un tissu ou d'une suspension de cellules, il faut impérativement **inhiber toute trace d'ARNase**.

Commentaire :

L'homogénéisation dans le tube de Potter se fait dans un tampon Tris-EDTA en présence de thiocyanate de guanidinium 4 M et de SDS. Les débris cellulaires sont sédimentés en 10 min à 10 °C.

Le surnageant contenant les acides nucléiques est déposé sur un gradient de densité comprenant au fond du tube une solution très dense de CsCl 5,7 M surmontée d'une couche intermédiaire de CsCl 2,4 M. Ce gradient est ultracentrifugé durant 24 heures à 30000 tours/min à la température ambiante.

On peut alors recueillir un culot d'ARN de masses moléculaires élevées qui seront soumis à l'extraction par le phénol et le chloroforme.

2.2.Extraction de l'ARN

Purification des ARNm

Parmi les acides ribonucléiques extraits des cellules → les **ARN messagers = ARNm = classe la plus étudiée**

se caractérisent par la présence du côté 3'-terminal d'une **longue queue poly(A)** synthétisée à la phase post-transcriptionnelle.

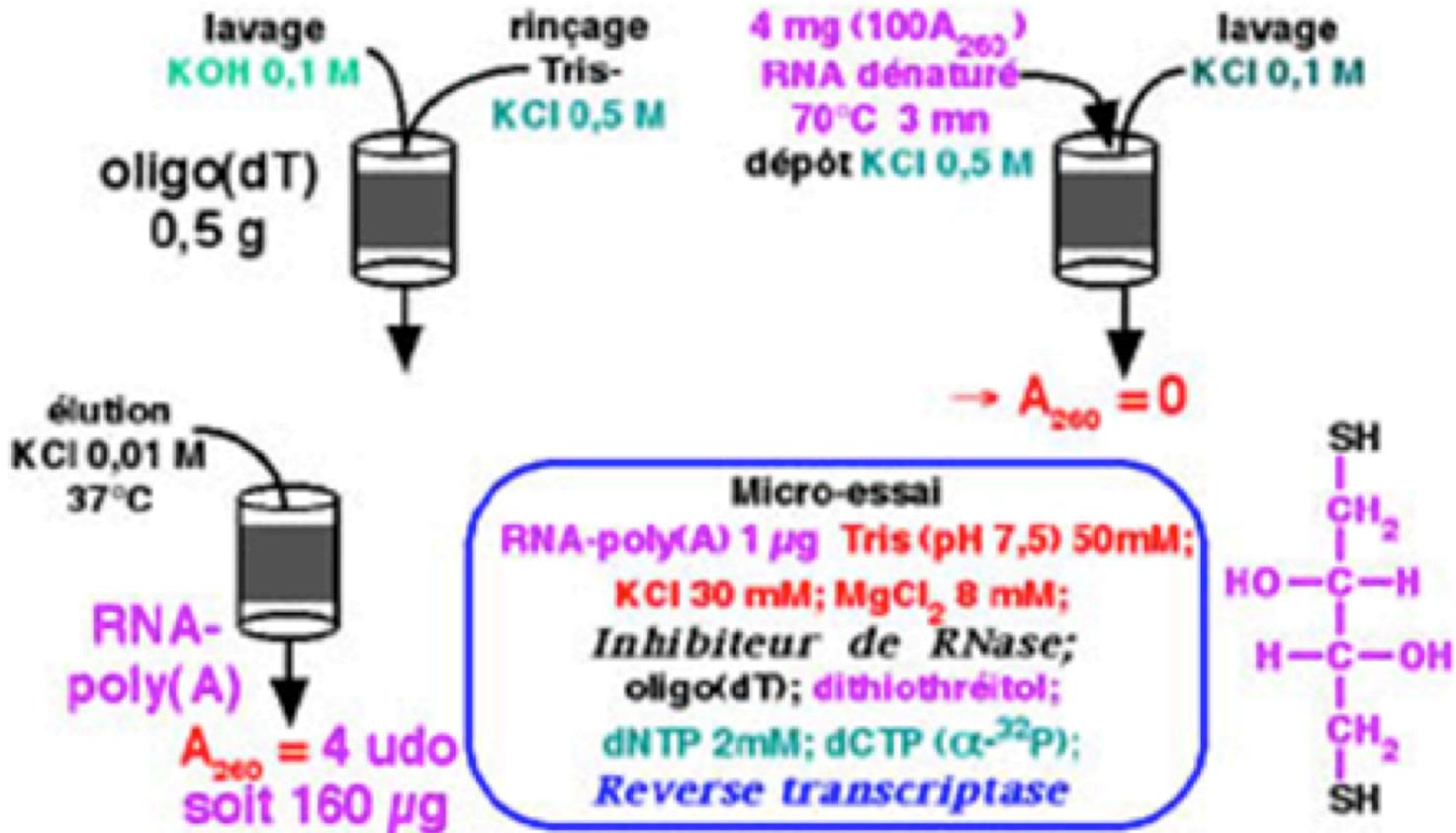


chromatographie d'affinité entre cette queue poly(A) et une colonne dont la phase fixe est pourvue de fragments d'oligo(dT) de quelques dizaines de nucléotides qui peuvent s'hybrider avec les RNA poly(A).

2.2.Extraction de l'ARN

Purification des ARNm

Purification du RNA-poly(A)



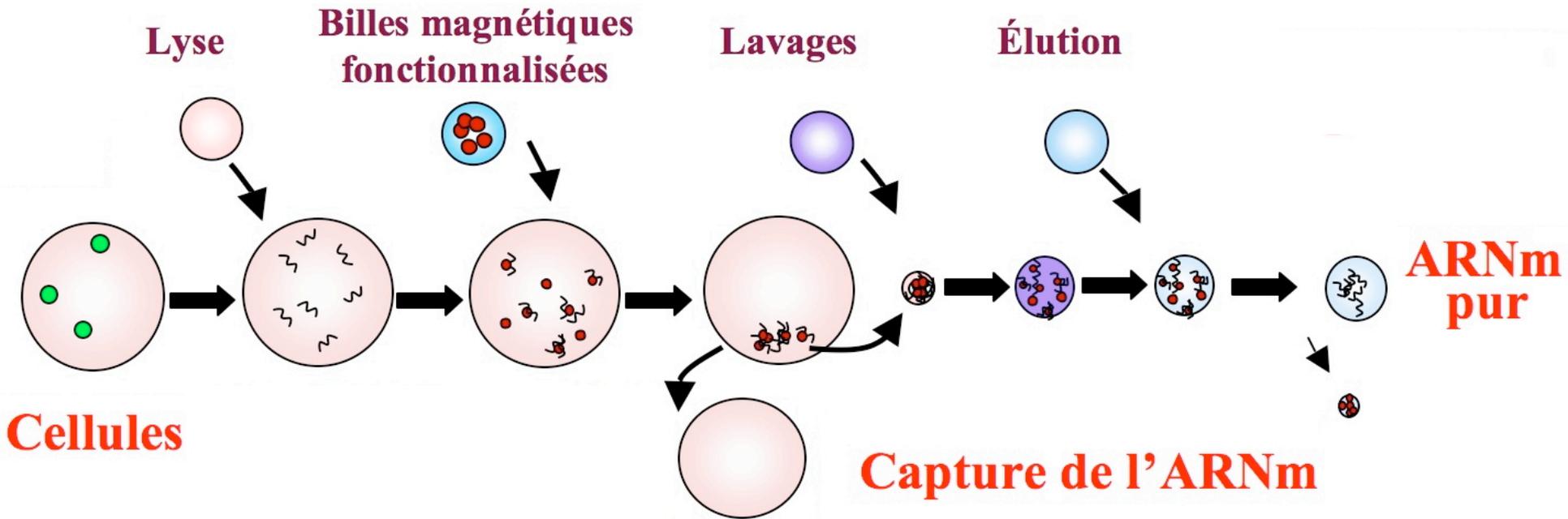
Commentaire :

Après avoir lavé la colonne en milieu alcalin (potasse), on charge les ARN totaux à haute force ionique (KCl 0,5 M) puis on rince la colonne avec du KCl 0,1 M en surveillant l'absorbance de l'éluat à 260 nm pour s'assurer de l'élimination des ARN non retenus par la colonne (ARNr, ARNt,...). Enfin, on élue la fraction retenue par la colonne en abaissant la concentration de KCl à 0,01 M et en élevant la température.

Un micro essai avec la reverse transcriptase permet de s'assurer de la qualité de ce RNA poly(A) comme matrice pour la synthèse de cDNA.

2.2.Extraction de l'ARN

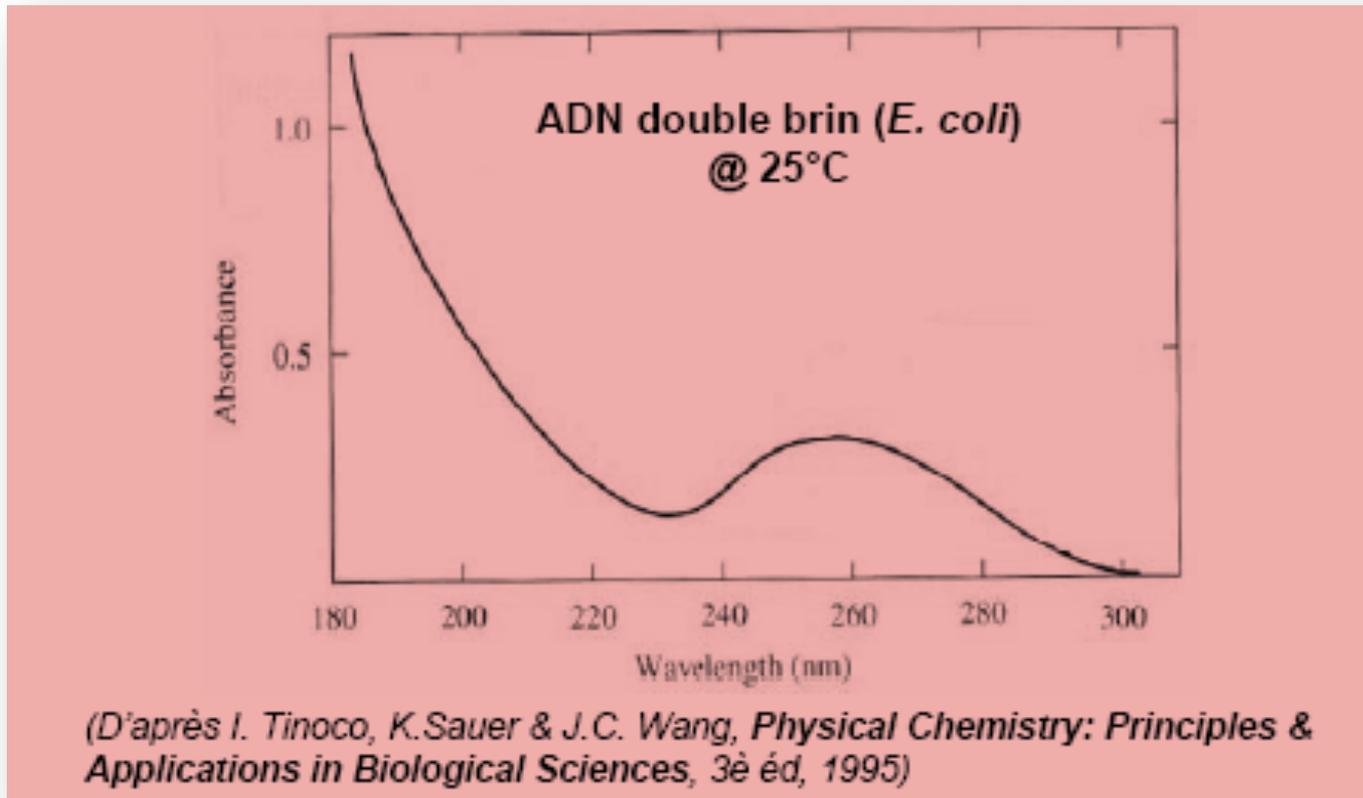
Purification des ARNm



2.3. Caractérisation des acides nucléiques

2.3.1. Spectres d'absorption des acides nucléiques

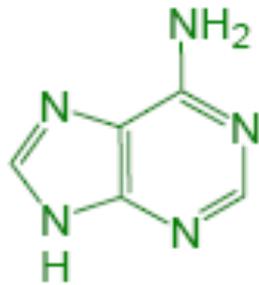
Les spectres d'absorption des acides nucléiques présentent une bande d'absorption maximale autour de **260 nm**.



2.3. Caractérisation des acides nucléiques

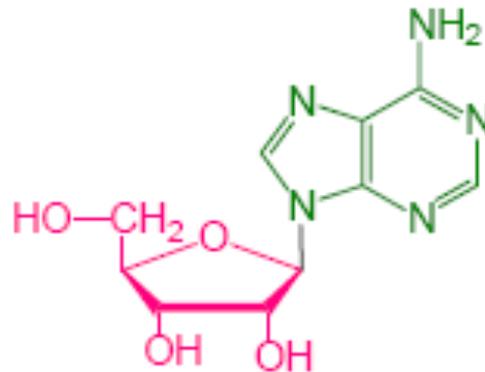
2.3.1. Spectres d'absorption des acides nucléiques

Tous les nucléotides ont leur λ_{\max} autour de 260 nm, valeur qui n'est pas affectée par le composant glucidique et le phosphate.



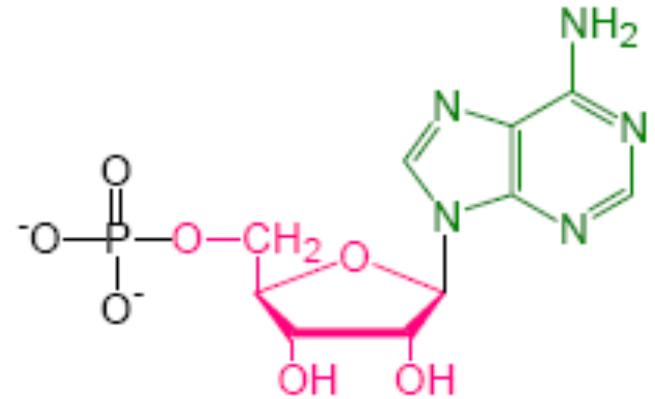
Adénine

$$\lambda_{\max} = 260.5 \text{ nm}$$
$$\epsilon = 13.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$



Adénosine

$$\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$$
$$\epsilon = 14.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$



Adénosine-5'-phosphate

$$\lambda_{\max} = 259 \text{ nm}$$
$$\epsilon = 15.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

2.3. Caractérisation des acides nucléiques

2.3.1. Spectres d'absorption des acides nucléiques

	λ_{\max} (nm)	$10^{-3} \epsilon_{\max}$ ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$)
<i>Ribonucleotides</i>		
Adenosine-5'-phosphate	259	15.4
Cytidine-5'-phosphate	271	9.1
Guanosine-5'-phosphate	252	13.7
Uridine-5'-phosphate	262	10.0
<i>Deoxyribonucleotides</i>		
Deoxyadenosine-5'-phosphate	258	15.3
Deoxycytidine-5'-phosphate	271	9.3
Deoxyguanosine-5'-phosphate	—	—
Thymidine-5'-phosphate	267	10.2

* Wavelengths of maxima and molar absorptivities of nucleotides at pH 7.

(D'après I. Tinoco, K. Sauer & J.C. Wang, *Physical Chemistry: Principles & Applications in Biological Sciences*, 3^e éd, 1995)

2.3. Caractérisation des acides nucléiques

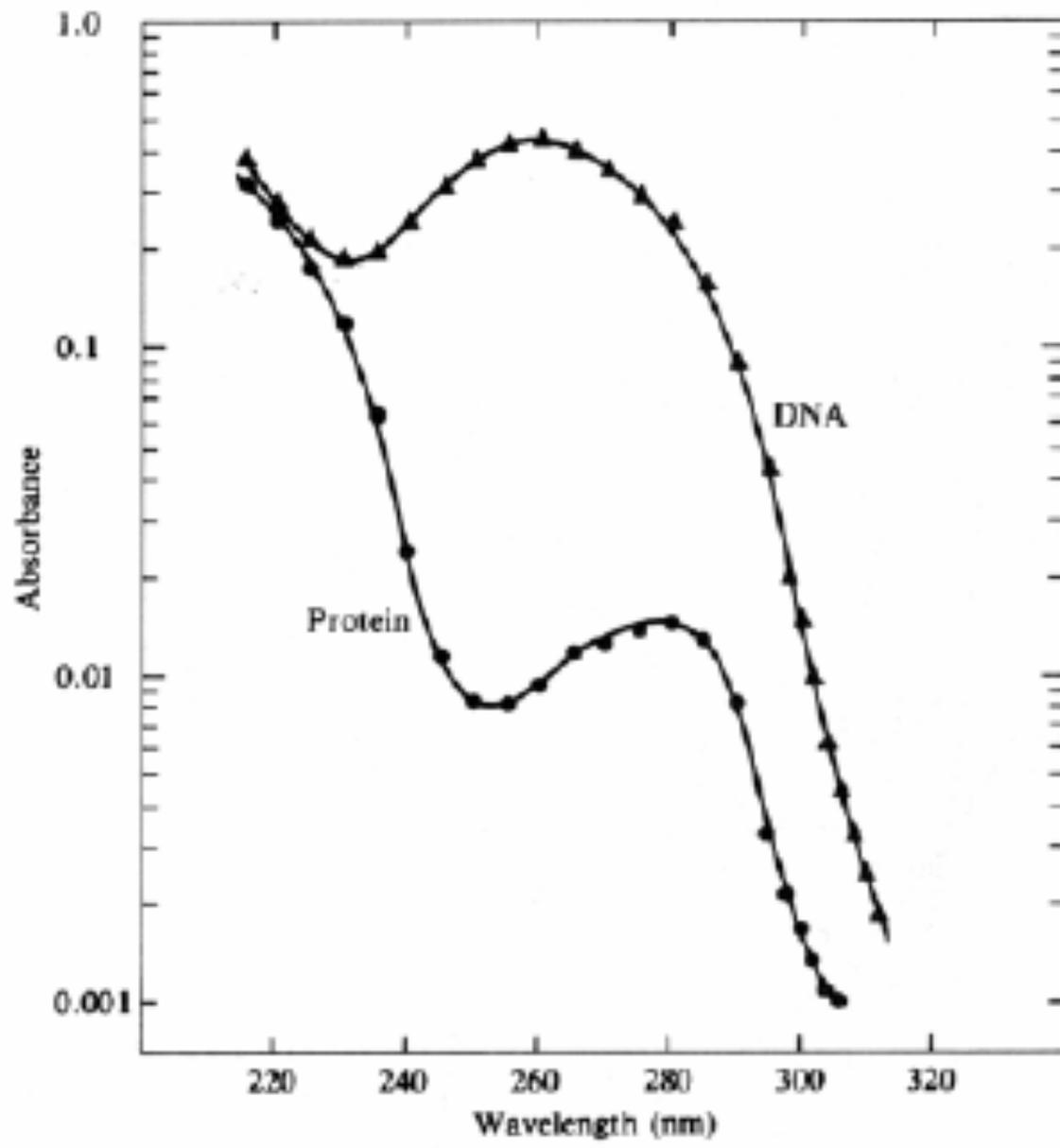
2.3.2. Dosage des acides nucléiques

- ✓ L'absorbance à 260 nm peut être mesurée pour estimer la concentration d'acide nucléique.
- ✓ Cette estimation est indispensable après extraction d'ADN à partir d'un matériel biologique.
- ✓ Pour des déterminations approximatives de la concentration des acides nucléiques purs, on peut assumer qu'une solution aqueuse contenant 50 µg/ml d'ADN double brin ou 25 µg/ml d'ADN simple brin ou 40 µg/ml d'ARN donne une valeur de $A_{260nm} = 1$.
- ✓ Dosage très sensible; on peut descendre jusqu'à une concentration massique de 2-3 µg/mL.

2.3. Caractérisation des acides nucléiques

2.3.2. Dosage des acides nucléiques

- ✓ L'absorbance à la longueur d'onde caractéristique de 280 nm (i.e. A_{280nm}) est communément utilisée pour estimer la concentration totale de protéines dans un échantillon.
- ✓ Les protéines sont des interférents. Il est donc indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm.
- ✓ Pour des échantillons d'ADN pur, $A_{260nm}/A_{280nm} = 1.8$.
Un rapport < 1.8 indique la présence de protéines, tandis qu'un rapport > 1.8 indique la présence d'ARN.



1

• **Introduction à la biologie moléculaire**

2

• **Méthodes d'étude des Acides nucléiques
(extraction et purification)**

3

• ***Séparation des acides nucléiques:
électrophorèse***

4

• **Endonucléases de restriction**

5

• **Vecteurs de clonage (plasmides)**

6

• **Marquage des acides nucléiques**

7

• **Amplification par PCR**

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

La technique la plus utilisée pour la séparation
des acides nucléiques: **L' électrophorèse**



Principe général:

Dans un milieu donné, la séparation des particules se fait en fonction de leur **charge électrique** et pour des charges identiques, en fonction de leur **taille**.

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

= technique de biologie moléculaire → séparer des fragments d'ADN de différentes tailles en les faisant migrer dans un **gel** en les soumettant à un **courant électrique**.

▶ Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur.

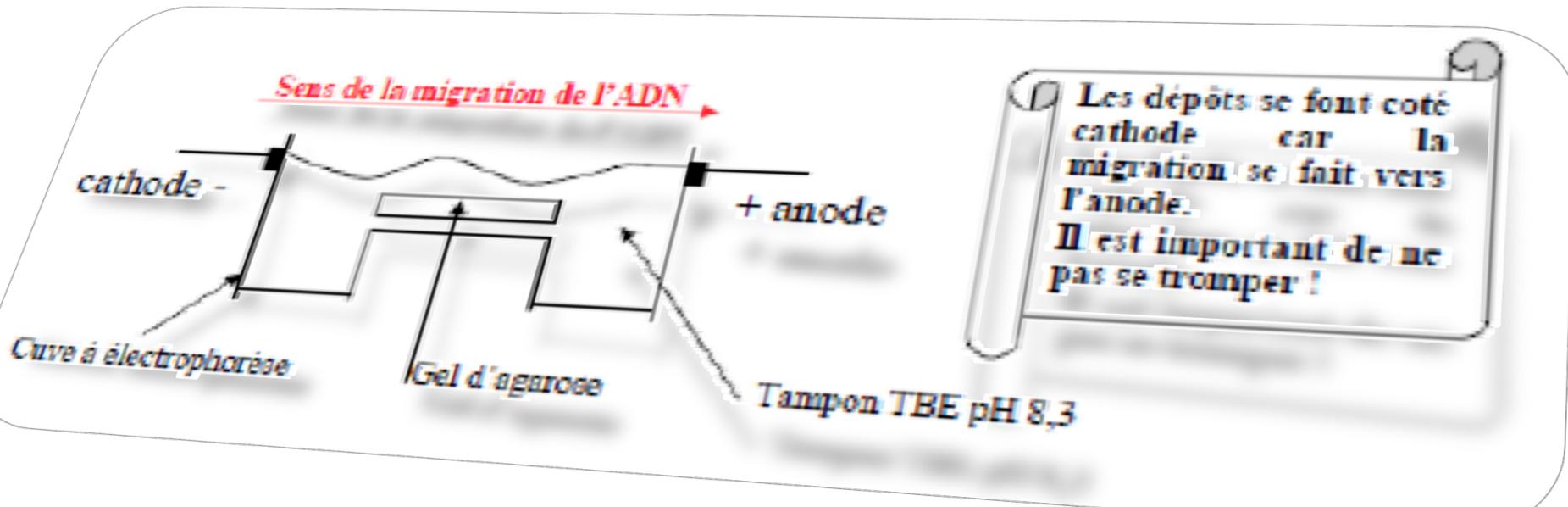
▶ Deux principaux polymères sont utilisés : l'**agarose** et le **polyacrylamide**.

Cette technique est assez simple à mettre en œuvre si on dispose des bons outils et de quelques astuces.

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

Principe:

basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement à pH 7~8, vers l'anode (+) sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel en fonction de la taille des molécules.



3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

Les applications de l' électrophorèse des acides nucléiques

- ✓ Estimation du poids moléculaire de fragments d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction
- ✓ Analyse d'ADN ou d'ARN après une amplification par PCR
- ✓ Séparation de fragments d' ADN digérés avant Southern blot ou d'ARN dans le cas de Northern Blot.

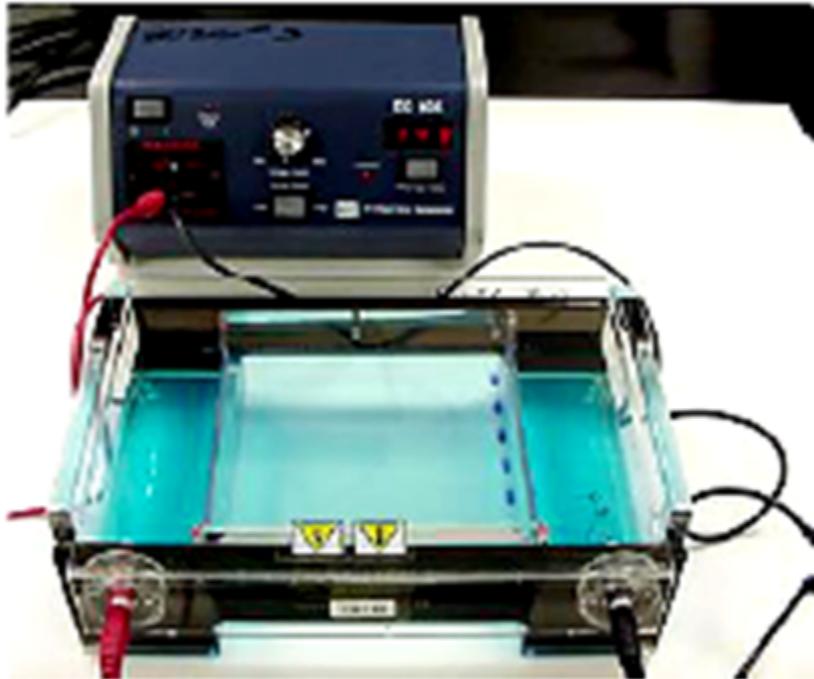
3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

3.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

- ✓ L' agarose = polymère à base d'agar purifié. Différentes puretés d'agarose sont disponibles. En général, de l'agarose de grande pureté à solidification lente est utilisé lorsque l'ADN doit être extrait du gel après migration.
- ✓ L'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5% à 2% (poids/volume) et permet de séparer des molécules de très grande taille, principalement de l'ADN ou de l'ARN ;

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

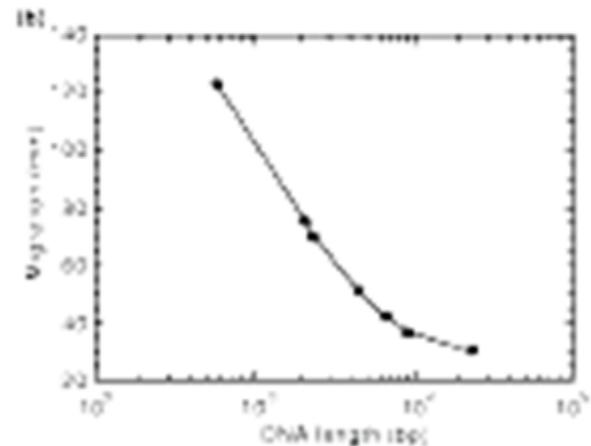
3.1. Electrophorèse sur gel d'agarose



L'ADN chargé (-) migre toujours vers le pôle + (anode)

L'ADN migre généralement en fonction de sa taille

Les pores du gel sont d'autant plus petit que le % en agarose ou en acrylamide est grand



3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

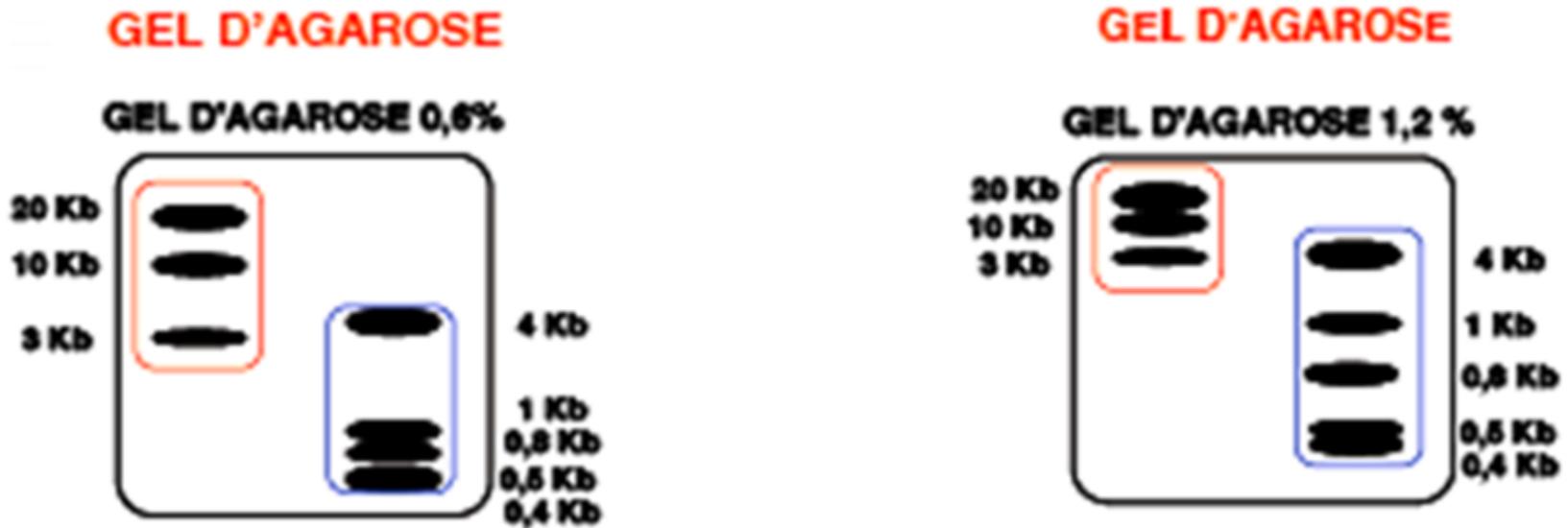
3.1.Électrophorèse sur gel d'agarose

Pouvoir de séparation d'ADN linéaire, double brin, selon la concentration d'agarose du gel

Concentration d'agarose (% en M/V)	Gamme de tailles idéales (en kb)
0.3	5 – 60
0.6	1 – 20
0.7	0.8 – 10
0.9	0.5 – 7
1.2	0.4 – 6
1.5	0.2 – 3
2.0	0.1 – 2

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

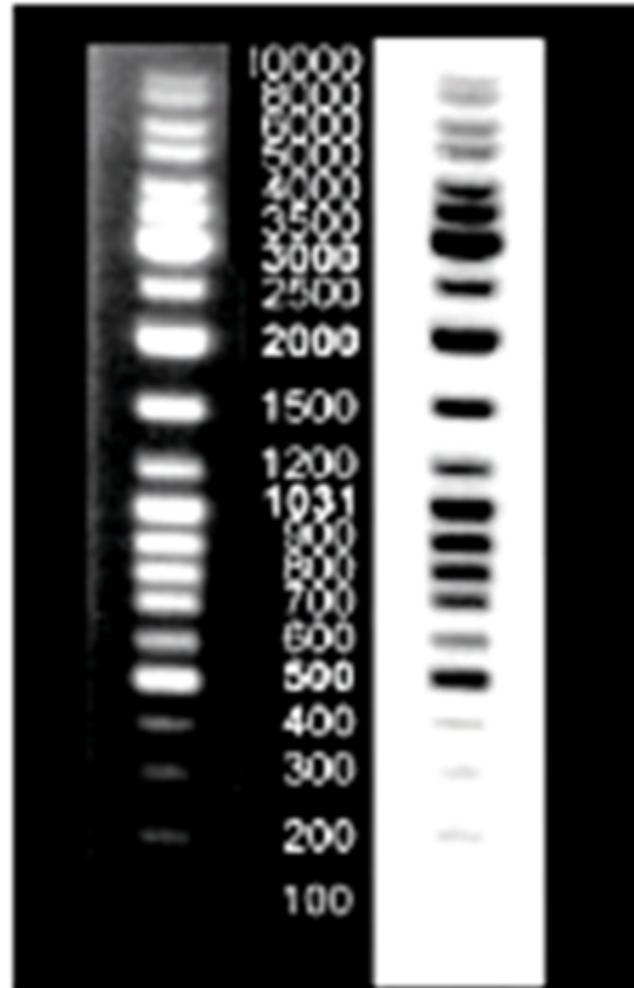
3.1. Electrophorèse sur gel d'agarose



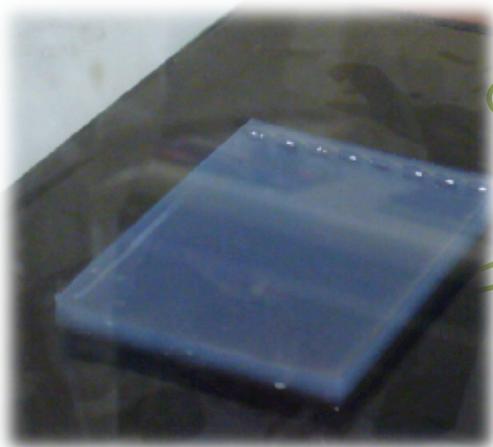
Le pouvoir de résolution d'un gel d'agarose dépend du % d'agarose. Il peut varier de 0,5 à 2%

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

3.1.Électrophorèse sur gel d'agarose

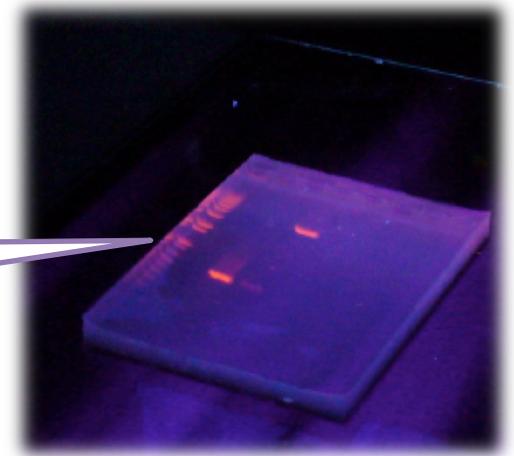


Le gel d' agarose n' est pas résolutif pour de petits fragments d' ADN (Inférieurs à 100 pb)



Un gel d'agarose avant éclairage sous ultraviolets

Le gel est exposé à des rayonnements ultraviolets, le BET colore l'ADN en une couleur rouge-orangée

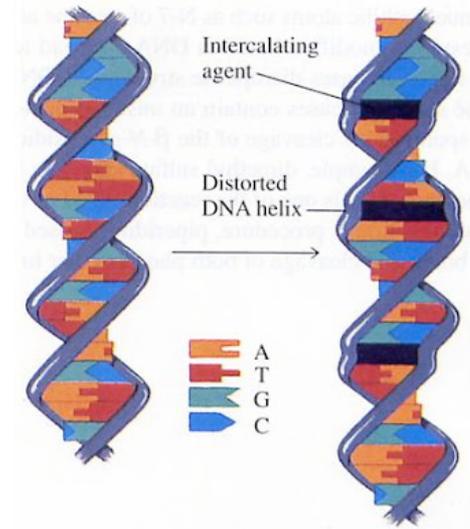
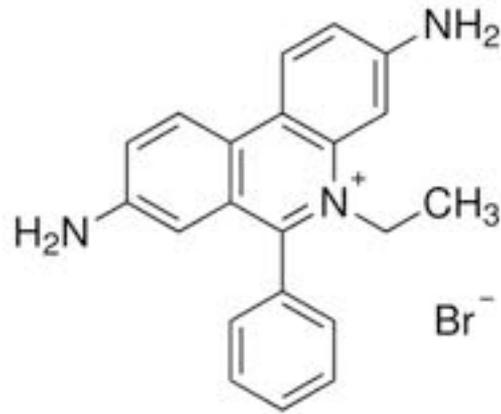


Photographie du gel



Puits :

1. Echelle de marqueur de poids moléculaire (1kbplus) 2. vide, 3. Un produit de PCR d'une taille légèrement supérieure à 500 paires de bases 4. Fragment d'environ 4.5kb d'un Plasmide digéré par une enzyme de restriction



Bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium (EtBr) = à la fois un agent intercalant et un fluorochrome.

Structure aromatique plane → s'intercaler entre les paires de bases → détorsion de la double hélice et émission de lumière (fluorescence) dans le rouge-orange lorsque le complexe ADN-EtBr est excité en lumière ultraviolette.

C'est l'une des principales méthodes de détection de l'ADN dans les gels d'électrophorèse. Il peut être remplacé par *l'iodure de propidium*

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

3.1.Électrophorèse sur gel d'agarose

Les avantages de l'électrophorèse en gel d'agarose sont:

- ✓ préparation aisée, rapide, et peu coûteuse des gels d'agarose
- ✓ pas de dénaturation des échantillons
- ✓ l'agarose plus ferme et moins toxique que le gel de polyacrylamide
- ✓ les échantillons peuvent être récupérés en vue d'analyses supplémentaires

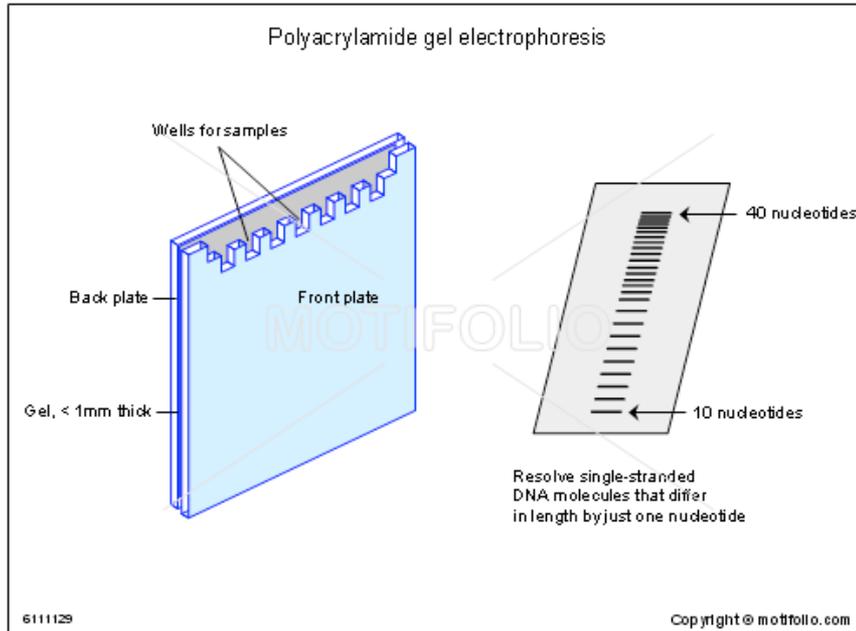
3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

3.2.Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

- ✓ L'**acrylamide** est le nom usuel du **2-propénamide (amide acrylique)** de formule brute C_3H_5NO .
- ✓ En biologie moléculaire, on utilise l'acrylamide polymérisé (**polyacrylamide**) pour réaliser des électrophorèses.
- ✓ Le polyacrylamide est utilisé à des concentrations de 4% à 20% (poids/volume) et permet de séparer des molécules plus petites d'acides nucléiques.
- ✓ On peut aussi faire varier sa réticulation (taux de ramification) lors de la polymérisation pour moduler les paramètres de séparation ;

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

3.2.Électrophorèse sur gel de polyacrylamide



3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

3.2.Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

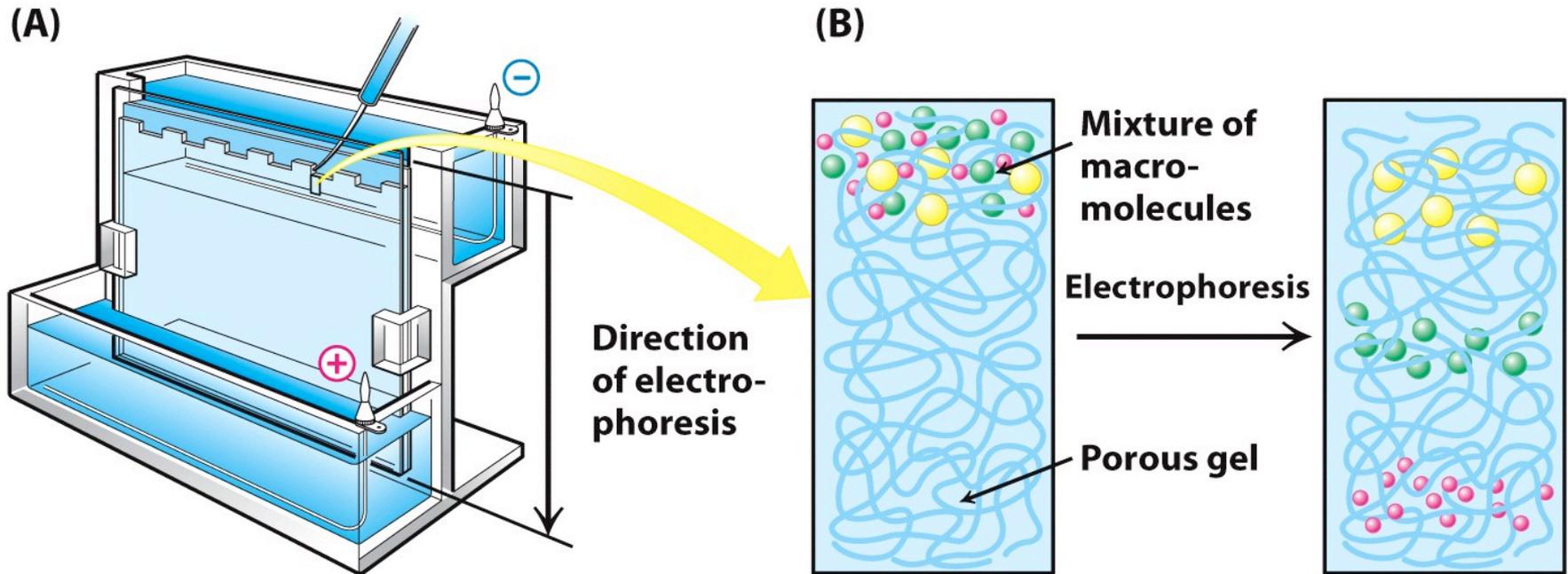
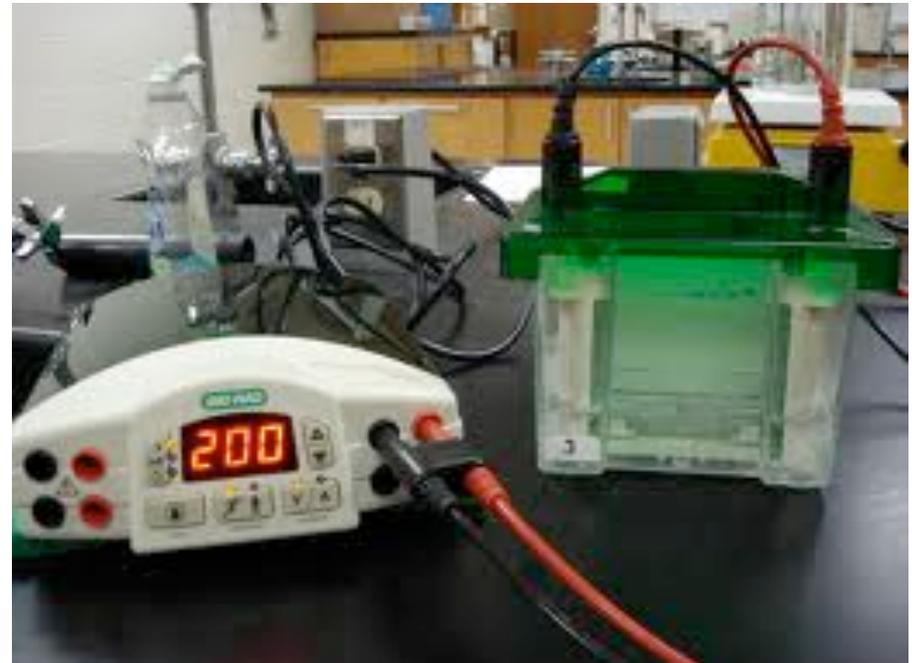


Figure 3.7
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

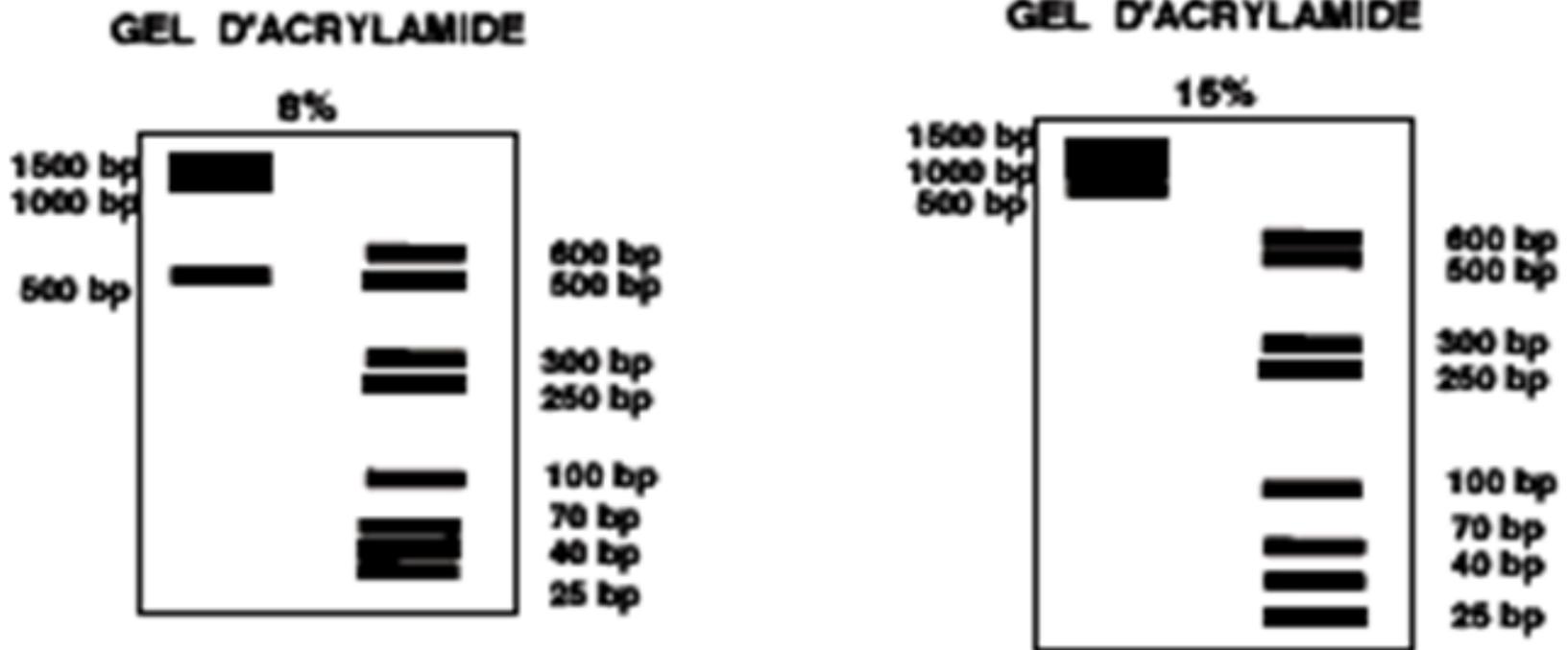
3.2.Électrophorèse sur gel de polyacrylamide



3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

3.2.Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

GEL D'ACRYLAMIDE NATIF (L'ADN est double brin)



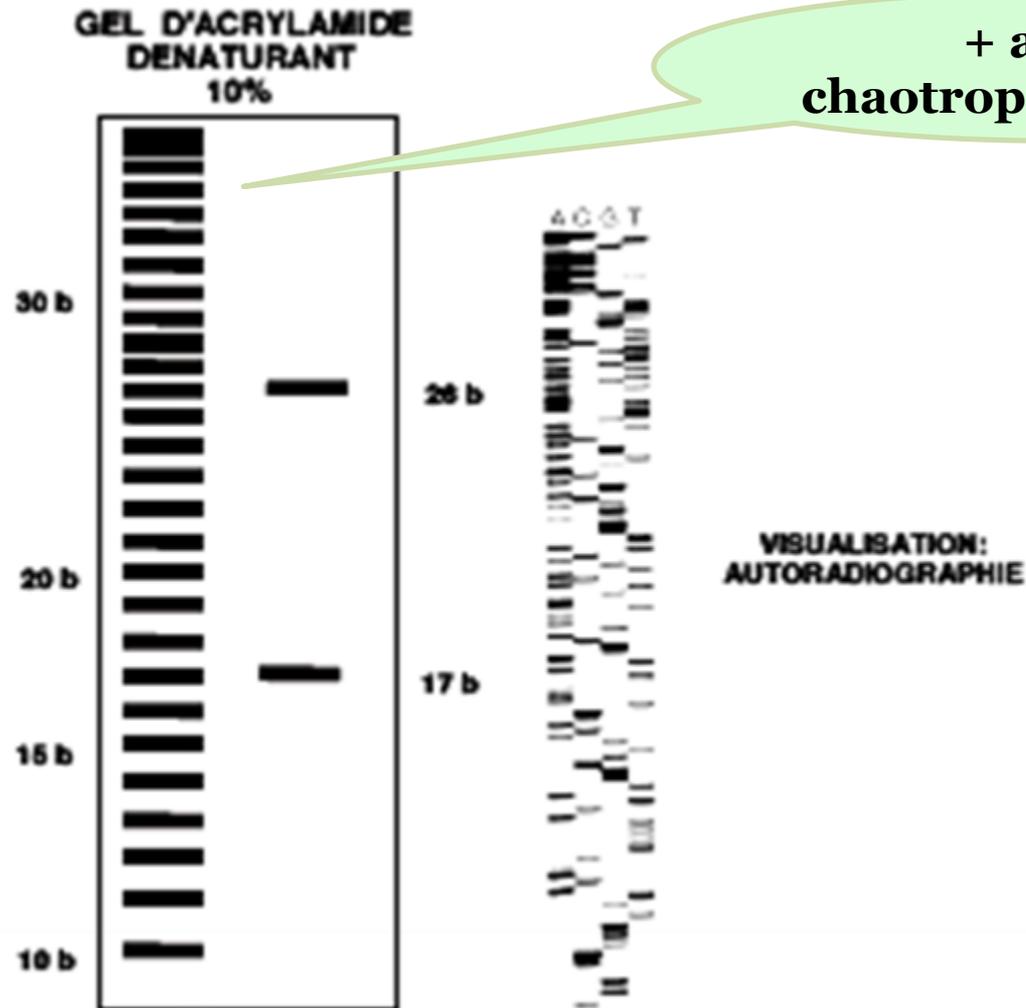
Efficace pour les petits fragments d'ADN entre 20 & 2000 paires de bases. (cartographie)

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

3.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

GEL D'ACRYLAMIDE DENATURANT

(L'ADN est simple brin)



Efficace pour les très petits fragments d'ADN entre 1 & 400 paires de bases. (séquençage)

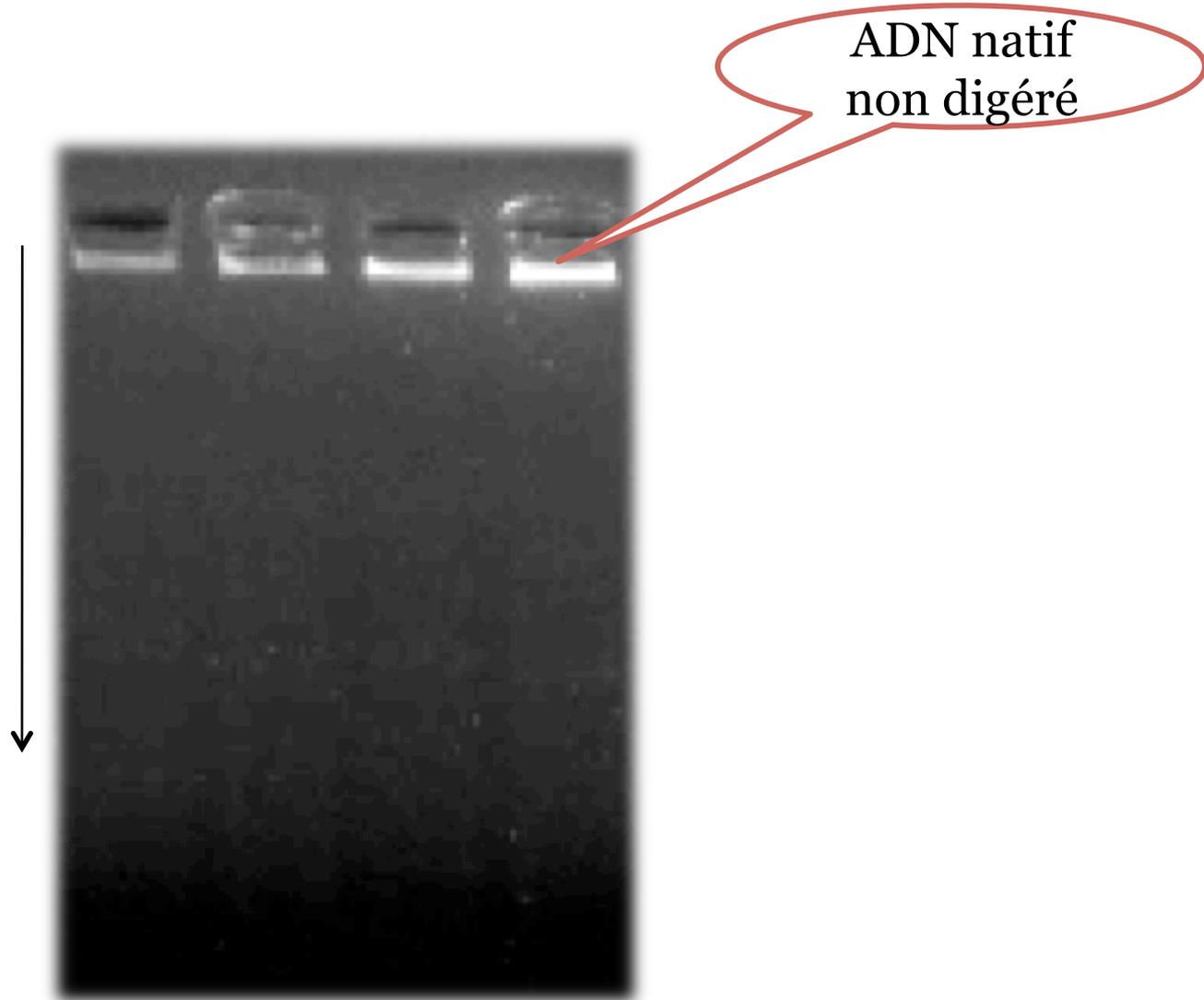
3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

3.3. Les facteurs affectant la migration

- ✓ La longueur de la molécule d'ADN : la séparation se fait en fonction du poids moléculaire et donc de la taille de l'ADN.
- ✓ La conformation de l'ADN: l'ADN plasmidique, non digéré par une enzyme de restriction, migre à différentes vitesses (du plus lent au plus rapide) : ADN circulaire, ADN linéaire et ADN superenroulé.
- ✓ La concentration du gel: l'augmentation de la concentration réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragment d'ADN de plus petite taille.
- ✓ Le voltage: plus le voltage est important, plus la vitesse de migration augmente. Toutefois le voltage est limité en intensité (5V/cm): un fort voltage → augmentation de température (fondre le gel).

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

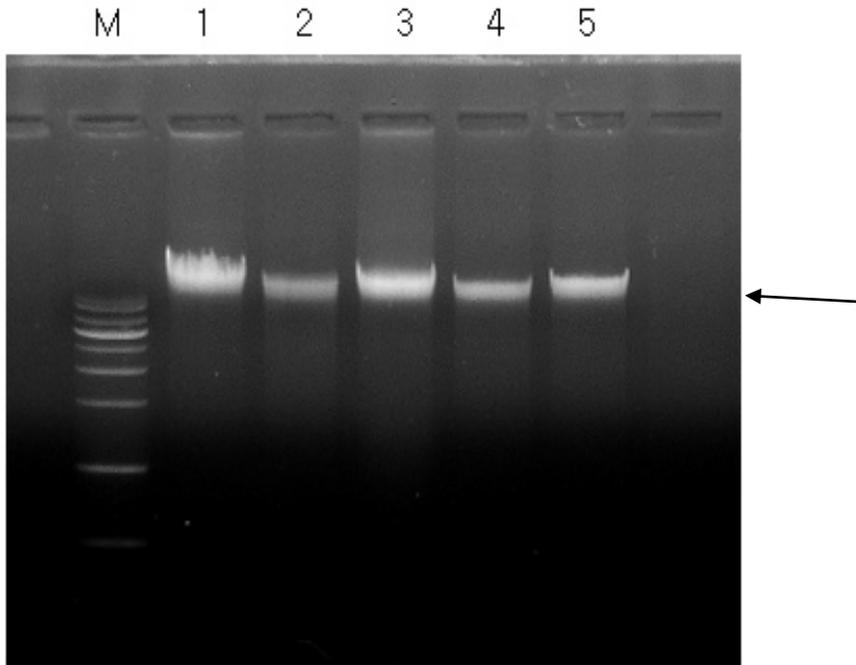
ASPECT DE L'ADN GENOMIQUE SUR GEL D' AGAROSE



3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

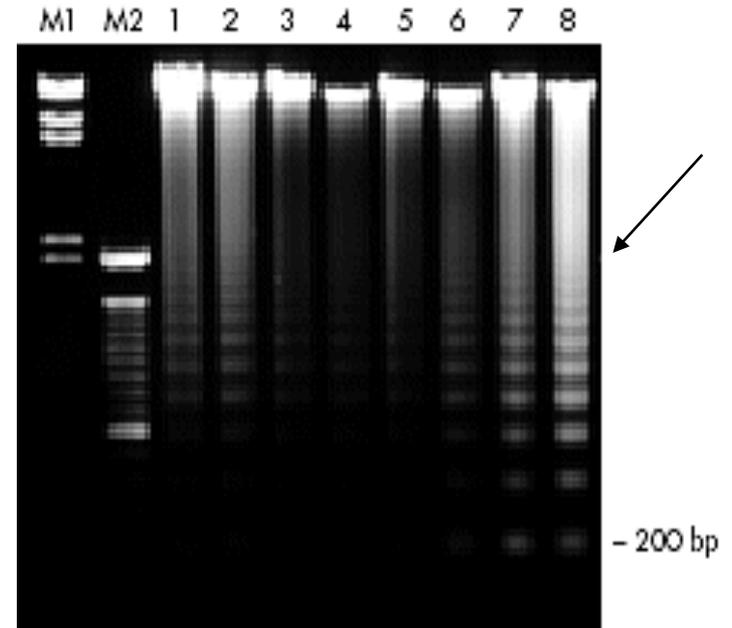
ASPECT DE L'ADN GENOMIQUE SUR GEL D' AGAROSE

INTACT DNA SAMPLES



Agarose gel electrophoresis of DNA purified with SpinClean™ Genomic DNA purification Kit.
M : 1 kb ladder marker,
line 1: Chicken whole blood(20ul sample volume),
line 2 : Human whole blood(100ul sample volume),
line 3 : E.coli, line 4 : L.brevis,
line 5 : Streptomyces hygroscopicus subsp.

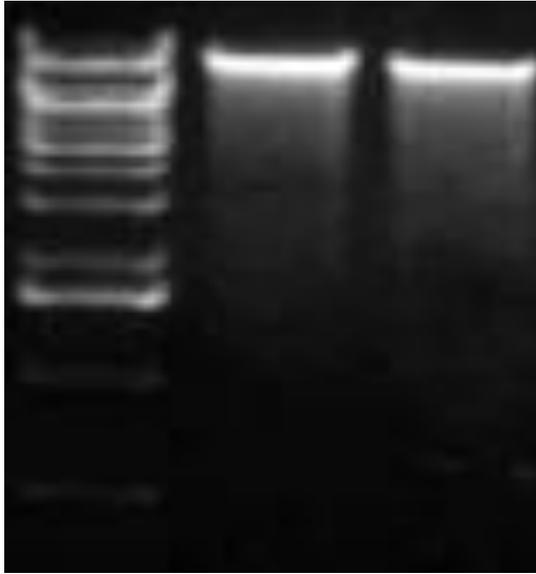
DEGRADED DNA SAMPLES



Genomic DNA from 8 blood samples stored at 4°C for 1 week. DNA was purified using the QIAamp DNA Blood Mini Kit. When blood is stored at 4°C the DNA is rapidly degraded due to apoptosis; the resulting apoptotic banding pattern can clearly be seen in these samples. M1: lambda-HindIII; M2:100 bp ladder.

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

Vérification de l'intégrité de l'ADN



High Quality Genomic DNA

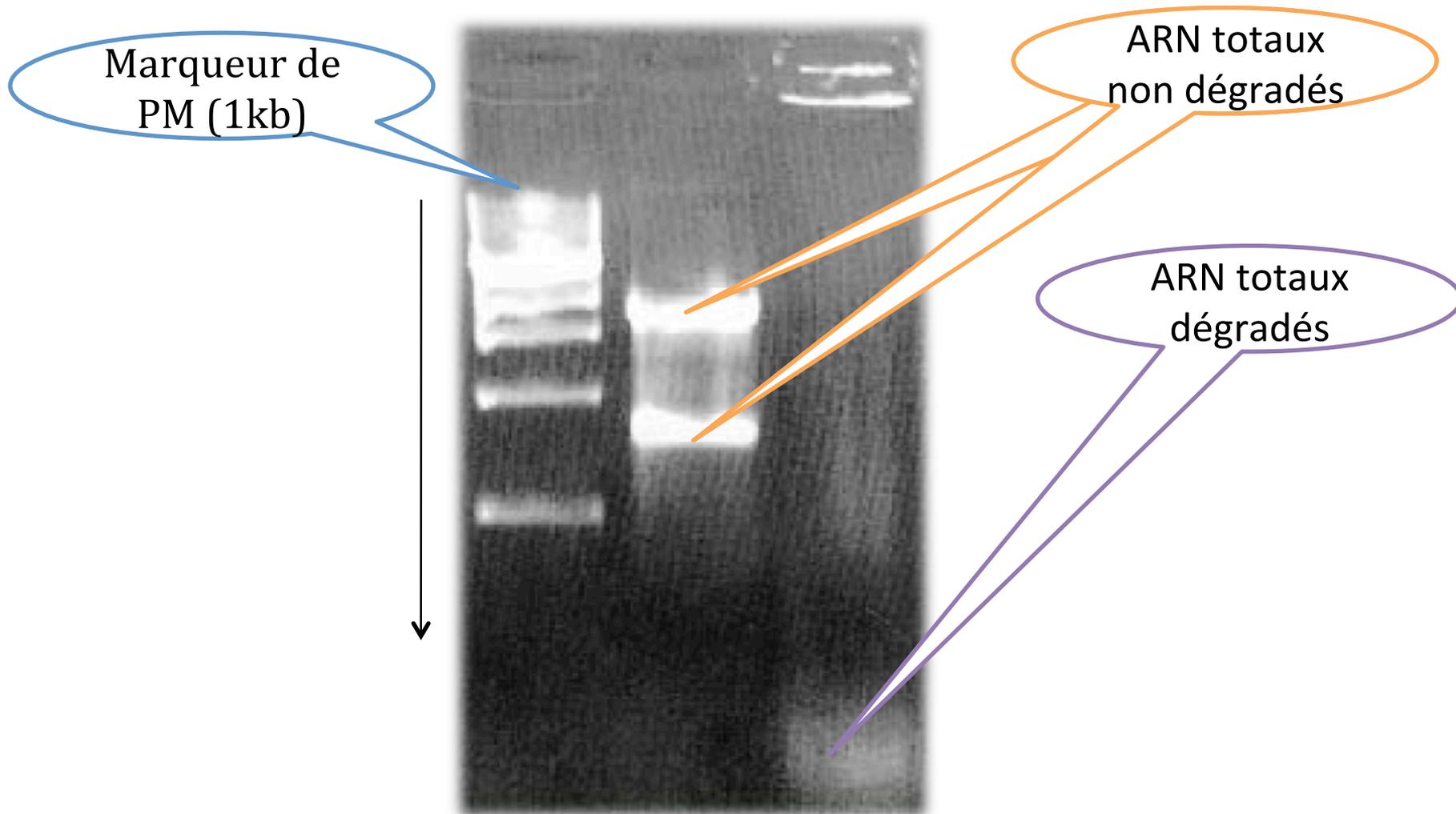
≥95% DNA will be of high molecular weight, migrating as intact band near the top of the gel

Very little evidence of smaller fragments indicated by a smear of many different sized DNA fragments

DNA	A_{260}	1.0	50 ug/mL
	A_{260} / A_{280}	1.6-1.8	High Purity
RNA	A_{260}	1.0 (in water)	40 ug/mL
	A_{260} / A_{280}	1.9-2.1 (in 10 mM Tris-Cl, pH 7.5)	High Purity

3. Séparation des acides nucléiques: électrophorèse

ASPECT DES ARN SUR GEL D' AGAROSE



1

• Introduction à la biologie moléculaire

2

• Méthodes d'étude des Acides nucléiques
(extraction et purification)

3

• Séparation des acides nucléiques
et électrophorèse

4

• *Endonucléases de restriction*

5

• Vecteurs de clonage (plasmides)

6

• Marquage des acides nucléiques

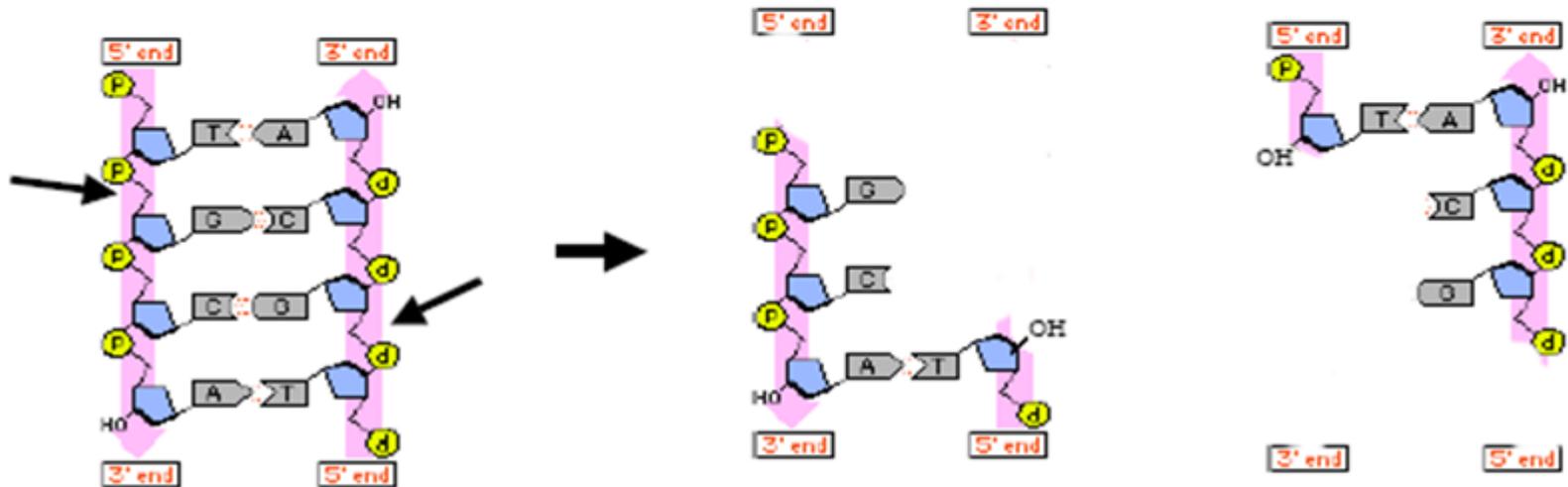
7

• Amplification par PCR

4. Endoncléases de restriction

4.1. Généralités

Définition: sont des enzymes bactériennes qui reconnaissent des séquences spécifiques sur l'ADN de 4 à 8 paires de bases, et qui clivent l'ADN sur les deux brins au niveau de ces sites. Elles coupent l'ADN au niveau des ponts phosphodiester.



Ces enzymes, naturellement présentes chez les bactéries, sont devenues des outils importants en génie génétique.

4. Endonucléases de restriction

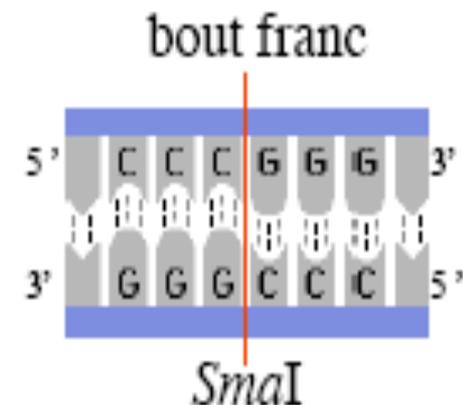
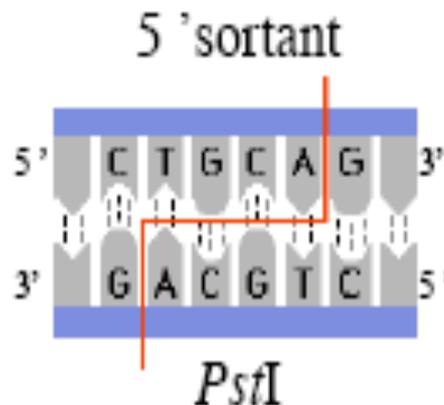
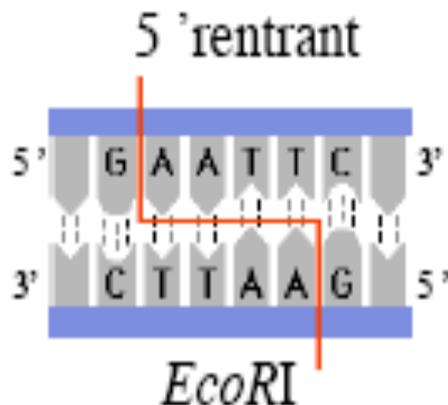
4.1. Généralités

Caractéristiques:

- la plupart des sites sont des séquences inversées répétées (palindromes) cas de *EcoRI*: 5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5'

- Coupure avec formation de bouts collants ou à bouts francs:



4. Endonucléases de restriction

4.2. Nomenclature

3 = Hydrolase

3.1.21.4

3.1 = Esterase

3.1.21 = Endonucléase produisant un 5'-phosphate

3.1.21.4 = Enzyme avec Mg (seul cofacteur)



BG 21

- Les enzymes de restriction sont des hydrolases (classe 3 de la E.C.) agissant sur des liaisons esters (sous-classe 3.1), c'est-à-dire des estérases.
- Parmi les estérases on distingue celles qui hydrolysent un acide nucléique en fragments polynucléotidiques (endonucléases) et en particulier celles dont les produits gardent leur phosphate 5' initial (sous-sous-classe 3.1.21).
- Enfin en fonction des cofacteurs, les enzymes de restriction ne nécessitent que la présence de l'ion Mg^{++} dans le milieu (3.1.21.4)
- Le nom de chaque enzyme est dérivé du nom d'espèce ou de variété de la Bactérie qui la produit. On écrit l'initiale du nom du genre, les deux initiales du nom de l'espèce, 1 lettre ou 1 nombre pour désigner la variété (ou souche) et après un espace un chiffre romain pour désigner successivement les différentes enzymes de restriction obtenues à partir de la même souche.

4. Endonucléases de restriction

4.2. Nomenclature

Enzyme	Organism from which derived	Target sequence (cut at *) 5' -->3'
<i>Ava</i> I	<i>Anabaena variabilis</i>	C* C/T C G A/G G
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G* G A T C C
<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigii</i>	A* G A T C T
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli RY 13</i>	G* A A T T C
<i>Eco</i> RII	<i>Escherichia coli R245</i>	* C C A/T G G
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	G G * C C
<i>Hha</i> I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	G C G * C
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	A* A G C T T
<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	G T T * A A C
<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G G T A C * C
<i>Mbo</i> I	<i>Moraxella bovis</i>	*G A T C
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	C T G C A * G
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	C C C * G G G
<i>Sst</i> I	<i>Streptomyces stanford</i>	G A G C T * C
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus G</i>	G * T C G A C
<i>Taq</i> I	<i>Thermophilus aquaticus</i>	T * C G A
<i>Xma</i> I	<i>Xanthamonas malvacearum</i>	C * C C G G G

Sites = 4 à 6
paires de bases



Coupure
fréquente
~ 3kb

Sites = 8
paires de bases



Coupure rare
~ 100-200kb

4. Endonucléases de restriction

4.3. Fragment de restriction

- **Produit de la digestion de l'acide désoxyribonucléique par une endonucléase spécifique d'une séquence de nucléotides.**

BG 20

- Les endonucléases de restriction sont des enzymes bactériennes participant à un mécanisme de défense des bactéries vis-à-vis des virus : système de restriction-méthylation.
- Elles catalysent la coupure de l'ADN non méthylé en des endroits caractérisés par une séquence spécifique de nucléotides (site de restriction). Les produits de cette digestion sont les fragments de restriction, dont la longueur, toujours la même pour un ADN donné, ne dépend que de la séquence primaire de cet ADN.
- L'analyse de la longueur des fragments de restriction, à la recherche de variations individuelles (polymorphismes de longueur des fragments de restriction = RFLP) est une des techniques d'analyse de la séquence primaire de l'ADN à la recherche de substitutions, d'insertions ou de délétions qui modifient le nombre de sites de restriction et donc la longueur des fragments de restriction.
- Les extrémités des fragments de restriction peuvent être formées de deux brins d'égale longueur (bouts francs) ou bien présenter un brin plus long que l'autre de quelques nucléotides (bouts collants).

Le nom d'enzyme de **restriction** provient de ce mécanisme, en effet la présence de ces enzymes dans les bactéries restreint l'infectiosité des bactériophages.

4. Endonucléases de restriction

4.4. Système de restriction-modification

- **Système de défense des Bactéries vis-à-vis des bactériophages, incluant des enzymes de restriction pour digérer l'ADN parasite et des enzymes de méthylation pour protéger l'ADN de la bactérie.**

BG 20/1

- Les Bactéries sont lysées sous l'effet de virus bactériophages dont l'ADN est répliqué par la Bactérie elle-même avant sa destruction.
- Pour détruire l'ADN du parasite la Bactérie exprime des gènes de restriction et de méthylation. Les gènes de restriction permettent la synthèse d'endonucléases coupant l'ADN en des sites très spécifiques.
- Afin de protéger l'ADN bactérien de l'hydrolyse par l'enzyme, une méthylase, codée par le gène de méthylation, va modifier les nucléotides de l'ADN bactérien en les méthylant pour qu'ils ne soient plus reconnus par l'enzyme de restriction.
- L'ensemble du gène de restriction et du gène de méthylation constitue un système de défense de la Bactérie vis-à-vis des phages.

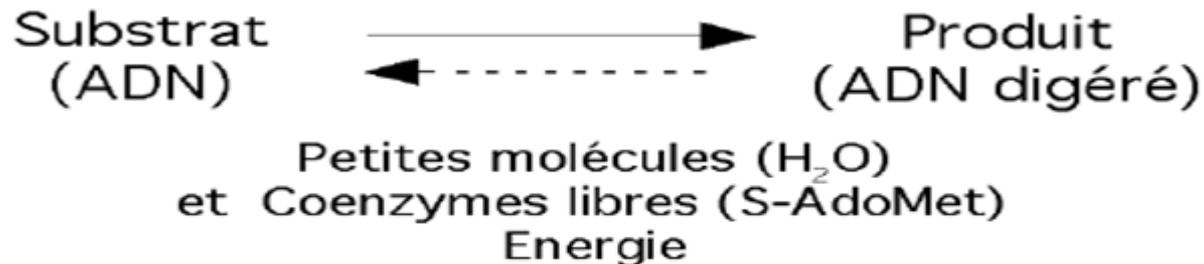
4. Endonucléases de restriction

4.5. Restriction: La réaction générale

Enzyme (de restriction)

Cofacteurs (Mg^{++}) et coenzymes liés

Conditions physiques : pH (tampon),
potentiel rédox (thiols), force ionique (ions, protéines)



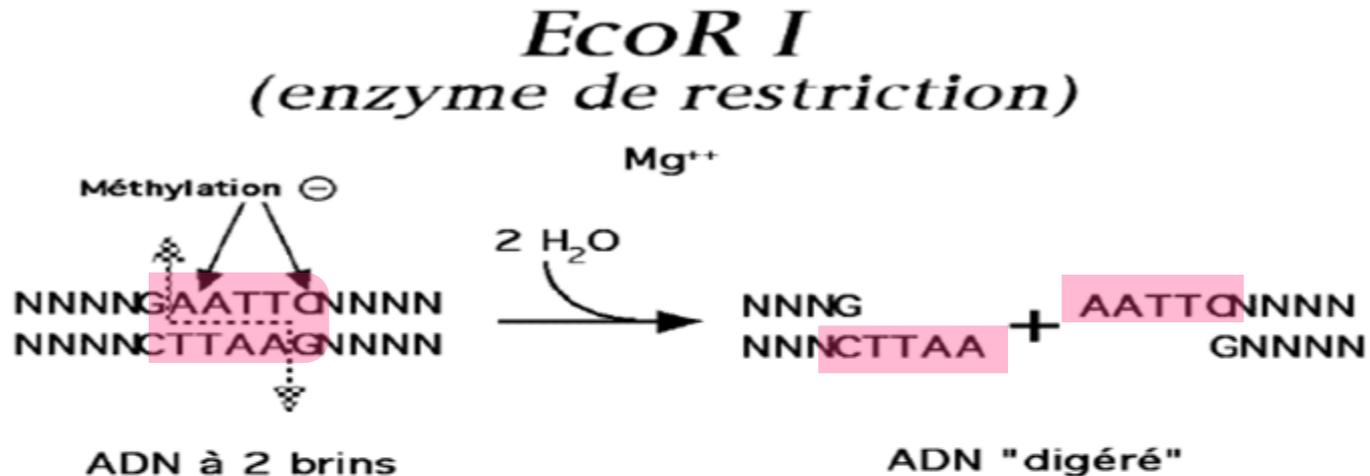
BG 22

- La réaction générale catalysée par les enzymes de restriction implique la présence dans le milieu réactionnel des facteurs suivants :
 - Enzyme (3.1.21.n)
 - Substrat : ADN double brin non digéré
 - Produit : ADN double brin digéré
 - Cofacteurs
- En général, seul le Mg^{++} est indispensable. Quelques endonucléases font appel à d'autres cofacteurs. Les enzymes de méthylation ont pour coenzyme la S-Adénosyl-Méthionine (S-AdoMet).
- Des facteurs physiques contrôlent aussi ces réactions : pH, potentiel d'oxydoréduction, force ionique. L'énergie libre dégagée par l'hydrolyse est suffisamment importante pour que la réaction ne soit pratiquement pas réversible dans les conditions habituelles.

4. Endonucléases de restriction

4.6. Exemples

3.1.21.4



BG 23

- *EcoR I* est une enzyme de restriction produite par *Escherichia coli*, souche R.
- Le site de liaison à l'ADN est formé de six paires de nucléotides :

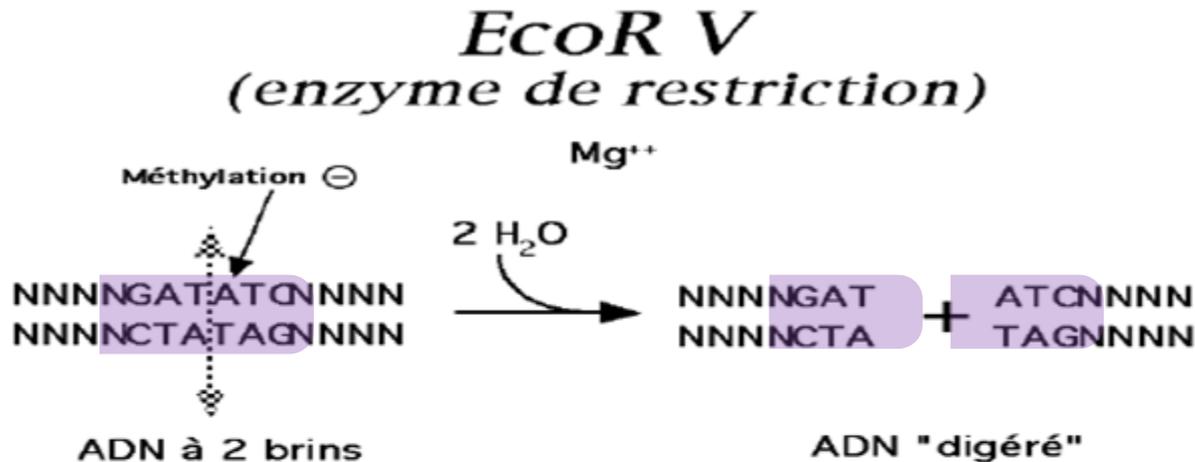
5' GAATTC 3'
3' CTTAAG 5'

- Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait loin du centre de symétrie du palindrome certaines paires de nucléotides restent non appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts collants ».
- La méthylation des adénines ou de la cytosine du site d'hydrolyse inhibent la reconnaissance du site par *EcoR I*. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

4. Endonucléases de restriction

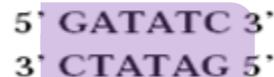
4.6. Exemples

3.1.21.4



BG 24

- *EcoR V* est une enzyme de restriction produite par *Escherichia coli*, souche R.
- Le site de liaison à l'ADN est formé de six paires de nucléotides :



- Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait au centre de symétrie du palindrome toutes les paires de nucléotides restent appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts francs ».
- La méthylation des adénines du site d'hydrolyse inhibe la reconnaissance du site par *EcoR V*. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

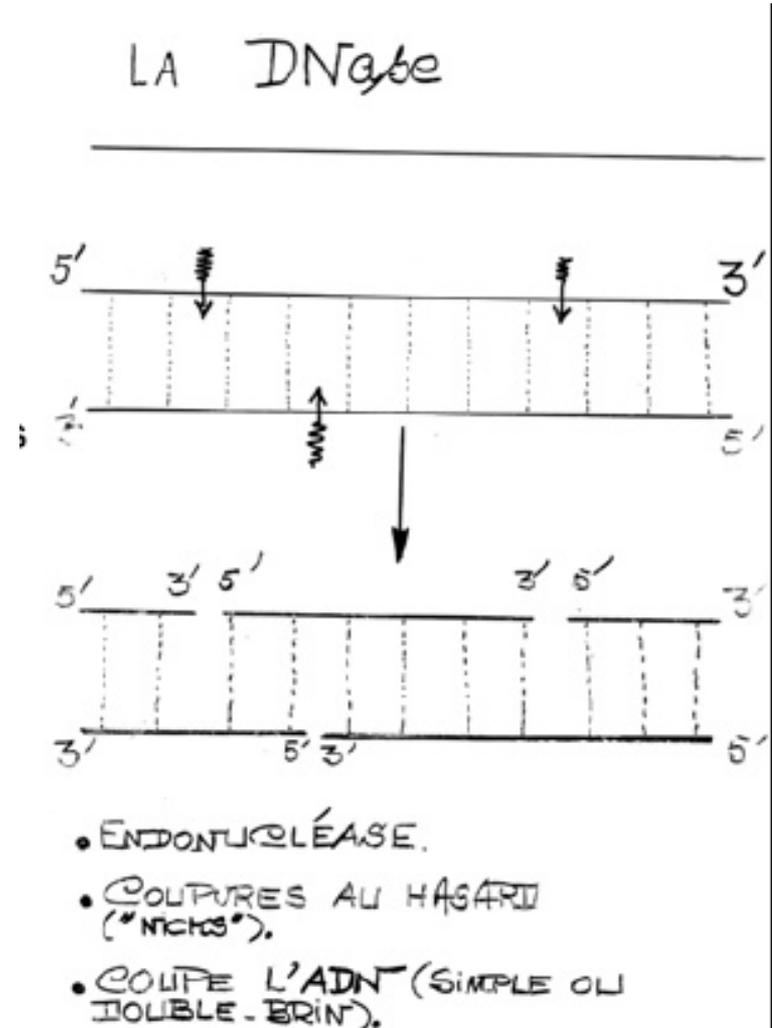
Autres enzymes coupant l'ADN

La DNase

La DNase1 est une **endonucléase** qui **dégrade** l'ADN double brin ou simple brin.

Les coupures («nicks») sont complètement **aléatoires sans spécificité de site**.

Les produits de la réaction sont des oligonucléotides qui possèdent un groupement phosphate en 5'.
L'activité dépend des ions bivalents (Mg^{2+} et Mn^{2+})



Autres enzymes coupant l'ADN

La Nucléase S1

La nucléase S1 dégrade l'ADN simple brin.

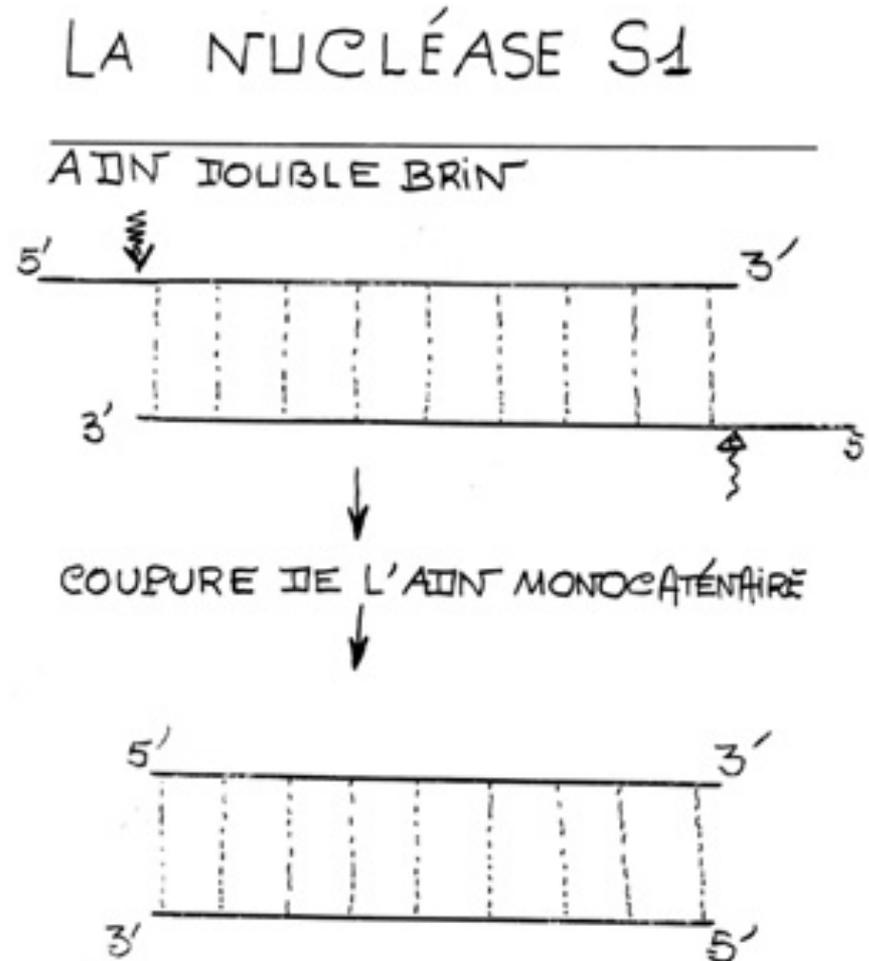
Nettoie les extrémités simples brins.

Coupe un misappariement

Sans activité sur le double brin « parfait »

Sans activité sur les hybrides ADN/ARN

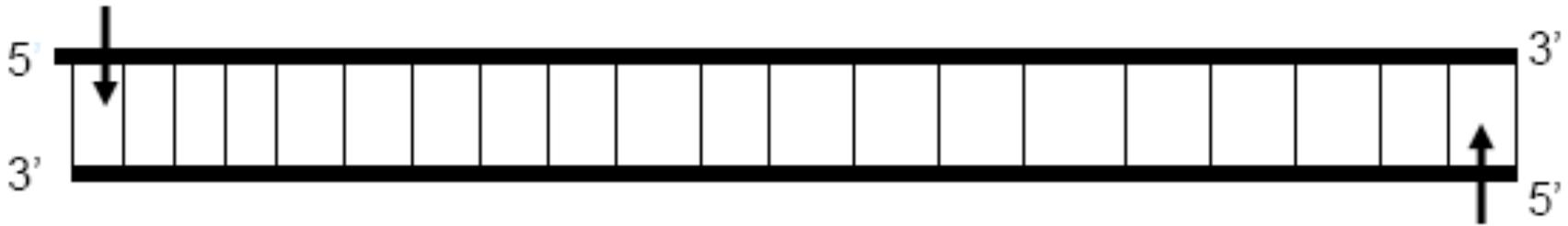
Cette enzyme est extraite d'un champignon



Autres enzymes coupant l'ADN

L'Exonucléase III

Cette enzyme catalyse l'hydrolyse séquentielle des nucléotides d'un ADN 3' → 5' à partir d'une extrémité 3' OH libre. Elle possède en plus une activité 3' phosphatase.



**Ces trois types d'enzyme ne font pas partie
des endonucléases de restriction.**

1

• Introduction à la biologie moléculaire

2

• Méthodes d'étude des Acides nucléiques
(extraction et purification)

3

• Séparation des acides nucléiques
et électrophorèse

4

• Endonucléases de restriction

5

• *Vecteurs de clonage (plasmides)*

6

• Marquage des acides nucléiques

7

• Amplification par PCR

5. Vecteurs de clonage

5.1. Définition

Un vecteur est un transporteur capable de conduire une molécule à pénétrer dans une cellule alors qu'elle n'est pas captée spontanément par cette cellule.

Les vecteurs sont principalement étudiés pour transporter des médicaments dans un type déterminé de cellules de l'organisme d'un malade, tout en mettant ce médicament à l'abri des enzymes de détoxification du sujet.

5. Vecteurs de clonage

5.2. Propriétés

En biologie moléculaire, certains vecteurs sont étudiés pour faire entrer un acide nucléique dans une cellule et permettre la réplication ou l'expression de cet acide nucléique dans la cellule qui le reçoit.

Un **vecteur de clonage**:

- est capable de réplication autonome dans une cellule hôte donnée (origine de réplication de type procaryotique et/ ou eucaryotique)
- possède un **polylinker** ou **site multiple de clonage**
- supporte l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand

5. Vecteurs de clonage

5.3. Types de vecteurs

Les **plasmides bactériens**, les **bactériophages** et de nombreux **virus** sont des vecteurs naturels permettant la transfection de différents types de cellules-hôtes.

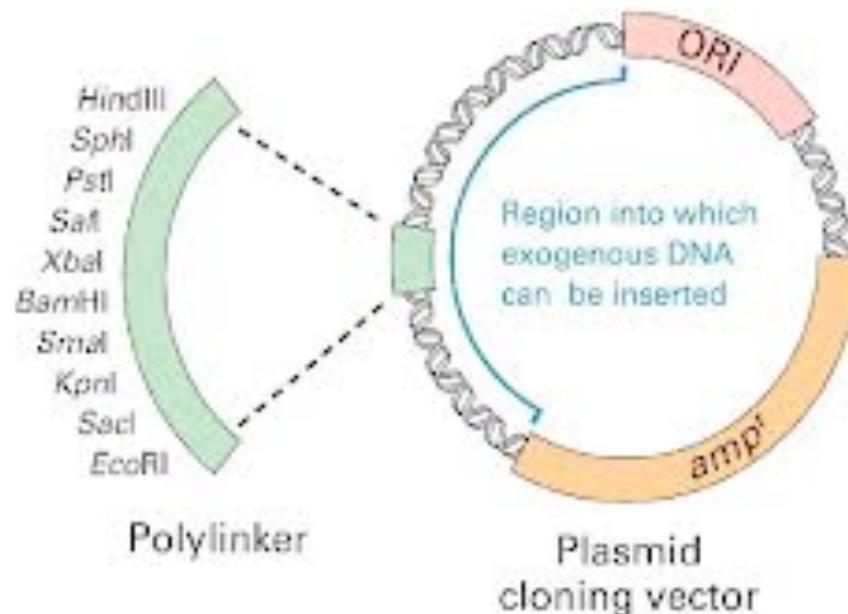
D'autres vecteurs encore plus performants ont été obtenus artificiellement à partir de ceux-là grâce à des manipulations génétiques (BAC/YAC).

Type de vecteur	ADN cloné en kb
Plasmide	20
Phage lambda	25
Cosmide	45
Phage P1	100
BAC (bacterial artificial chromosome)	300
YAC (yeast artificial chromosome)	1000

5. Vecteurs de clonage

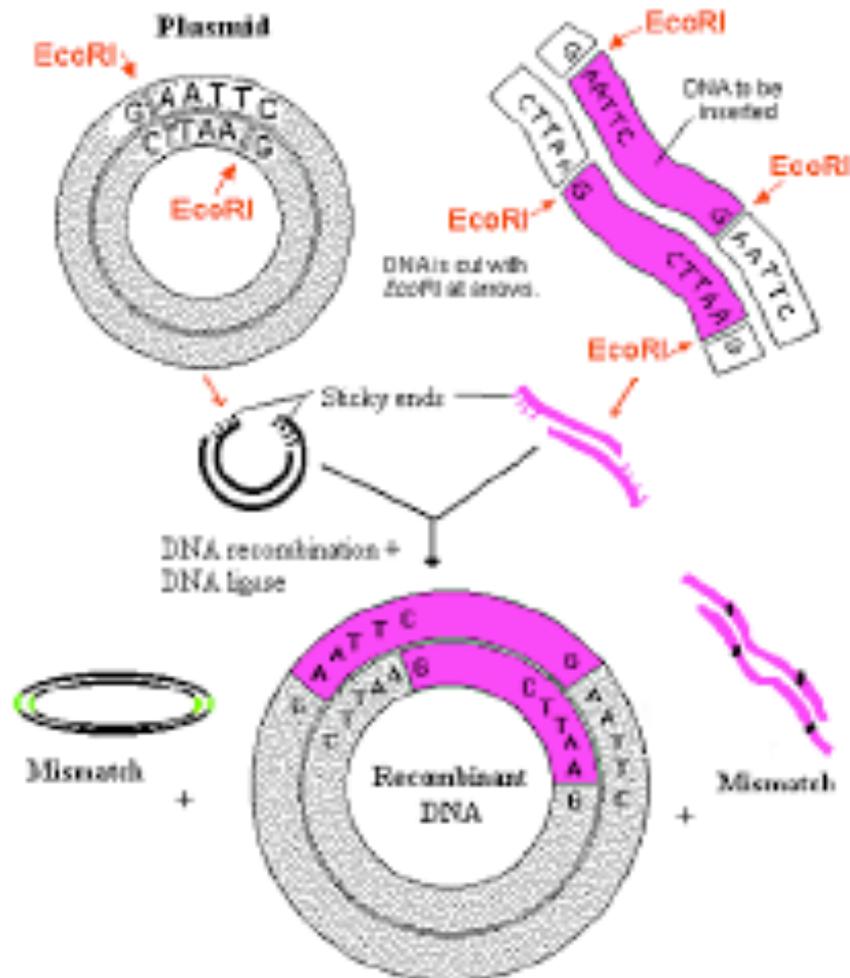
5.4. Les plasmides: vecteurs de clonage

- ✓ Molécule d'ADN de taille réduite, d'origine bactérienne
- ✓ Molécule d'ADN circulaire
- ✓ Peut être considérée comme un minichromosome capable de réplication autonome
- ✓ Confère la résistance à un ou plusieurs antibiotiques



5. Vecteurs de clonage

5.4. Les plasmides: vecteurs de clonage



5. Vecteurs de clonage

5.5. Les cellules hôtes

Les cellules qui sont habituellement transfectées par des vecteurs contenant des fragments d'ADN, sont destinées à permettre d'amplifier ce vecteur en même temps que leur croissance.

Des bactéries comme *Escherichia coli* sont utilisées pour recevoir des plasmides. Certaines souches de cette espèce sont plus particulièrement développées pour permettre la transfection de certains vecteurs :

- ✓ souche **DH5 α** pour les plasmides **pUC18** ou **pUC19**
- ✓ souche **HB 101** pour le plasmide **pBR322**,
- ✓ souche **JM 109** dépourvue d'opéron lactose pour les **vecteurs à β -galactosidase**.

1

• Introduction à la biologie moléculaire

2

• Méthodes d'étude des Acides nucléiques
(extraction et purification)

3

• Séparation des acides nucléiques
et électrophorèse

4

• Endonucléases de restriction

5

• Vecteurs de clonage (plasmides)

6

• *Marquage des acides nucléiques*

7

• Amplification par PCR

6. Marquage des acides nucléiques

6.1. Les sondes d'acides nucléiques

Une sonde est un marqueur qu'on introduit dans un milieu biologique pour que ses propriétés vis-à-vis des constituants de ce milieu soient révélées par l'émission d'un signal détectable par nos instruments de mesure.

Les oligonucléotides sont employés comme sondes parce qu'ils peuvent s'hybrider spécifiquement avec une séquence d'un acide nucléique dans un milieu biologique. Lorsqu'elles sont marquées (atomes radioactifs, biotine, fluorochromes) leur présence dans le milieu peut être suivie.

6. Marquage des acides nucléiques

6.1. Les sondes d'acides nucléiques

Donc par définition:

Une **sonde nucléique** = Séquence d'ADN ou d'ARN marquée (par un composé fluorescent, un radioisotope, ou une enzyme) que l'on utilise pour détecter des séquences homologues (complémentaires) par hybridation *in situ* ou *in vitro*.

6. Marquage des acides nucléiques

6.1. Les sondes d'acides nucléiques

Fragment d'ADN ou ARN marqué:

- ✓ sonde radioactive (incorporation de nucléotides radioactifs)
- ✓ sonde froide

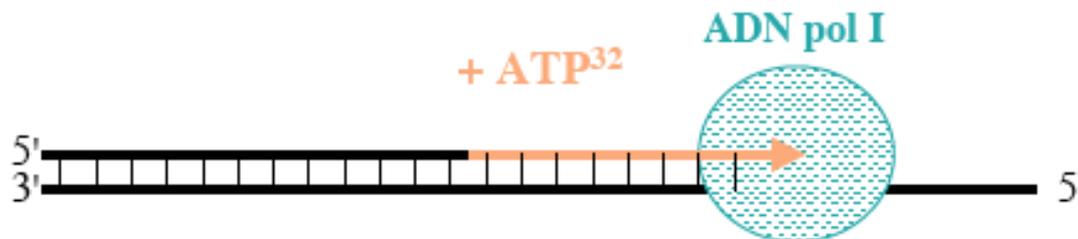
générée in vitro avec une séquence complémentaire de la séquence recherchée:

- ✓ fragment de restriction
- ✓ produit PCR
- ✓ synthèse "commerciale"

6. Marquage des acides nucléiques

6.2. Les sondes radioactives (chaudes)

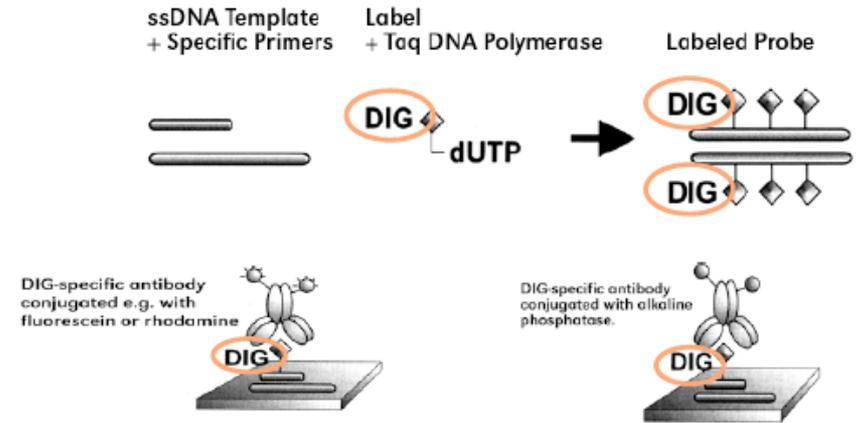
- sondes mono ou double brins
- Phosphate³² (radio-isotope le + utilisé), Soufre³⁵, H³ (tritium)
- Incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radiomarqués
 - **marquage en 5'**: T4 polynucléotide kinase ajoute un P³² en 5' (sonde peu radioactive)
 - **marquage en 3'** :
 - ✓ avec une ADN polymérase: ADN pol I ou T4, Taq pol (PCR) (sondes très radioactives)
 - ✓ avec une exonucléase
 - ✓ avec une terminal transférase



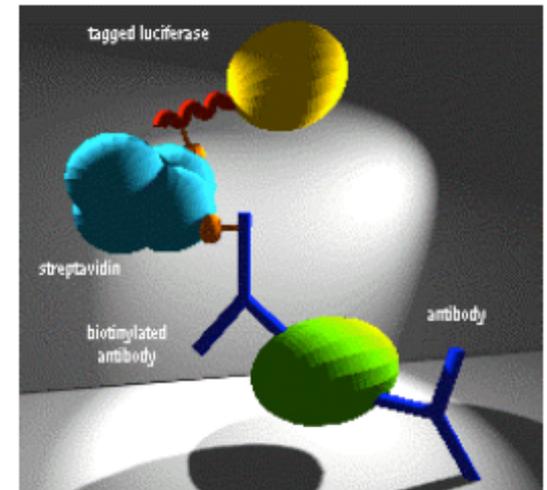
6. Marquage des acides nucléiques

6.3. Les sondes froides

✓ Marquage par la **Digoxygenine**:



✓ Marquage par la **biotine-streptavidine**:



1

• Introduction à la biologie moléculaire

2

• Méthodes d'étude des Acides nucléiques
(extraction et purification)

3

• Séparation des acides nucléiques
et électrophorèse

4

• Endonucléases de restriction

5

• Vecteurs de clonage (plasmides)

6

• Marquage des acides nucléiques

7

• *Amplification par PCR*

7. L' amplification d' un Fragment d' ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

7.1. Historique

- ✓ Procédure rapide pour l' amplification enzymatique *in vitro* d' un segment d' ADN spécifique
- ✓ Développée par Kary Mullis en 1985 (Nobel prize in 1993)



- ✓ Les bases théoriques ont été décrites par Kleppe K. en 1971

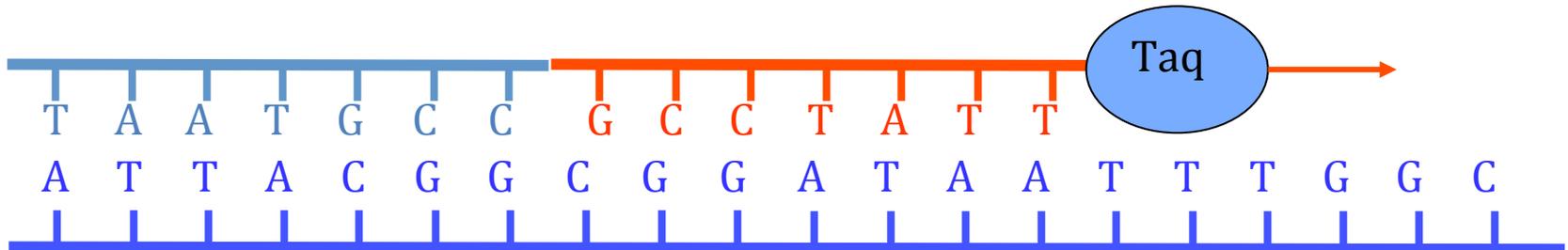
7. La PCR: Polymerase Chain Reaction

7.2.Principe de la PCR

But?

→ multiplier une séquence d'ADN à des millions d'exemplaires en quelques heures.

L'enzyme clé = Taq Polymérase



L'ADN polymérase synthétise l'ADN double brin en présence de matrice et d'amorce.

→ Augmentation de la production de l'ADN double brin au cours des cycles.

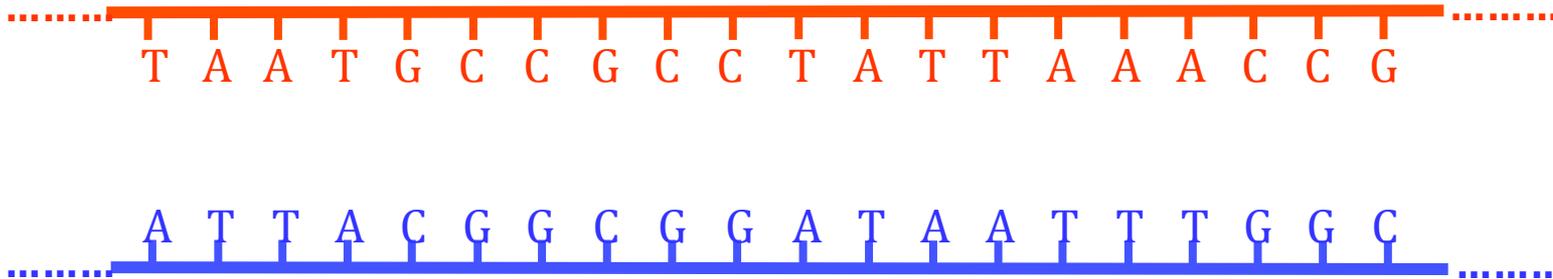
Comment?

7. La PCR: Polymerase Chain Reaction

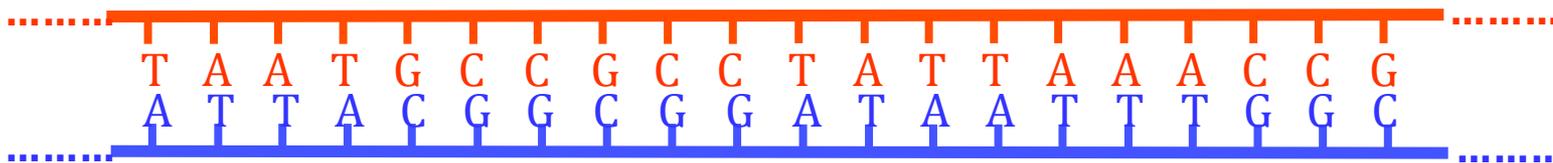
7.2.Principe de la PCR

L'hybridation de séquences complémentaires

↗ T° (94°C): dénaturation



↘ T° : hybridation des brins complémentaires



- ✓ l'ADN double brin (ds) se dénature à haute température.
- ✓ L'ADN simple brin est capable de s'hybrider avec un autre brin complémentaire à température adéquate.

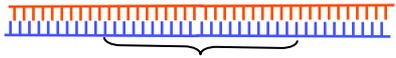
7. La PCR: Polymerase Chain Reaction

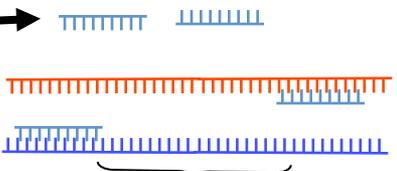
7.2.Principe de la PCR

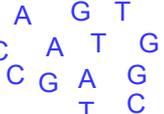
Les réactifs:



→  Enzyme Taq polymérase extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*.
Température d'activité: 72°C. Thermostable à 95°C.

→  ADN cible
Séquence à amplifier

→  2 Amorces oligonucléotidiques (= Primers) : courtes
séquences d'ADN (20-30 bases) complémentaires de
séquences encadrant le fragment à amplifier
Séquence à amplifier

→  Des nucléotides= dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) = déoxynucléotides-
triphosphates

→ Tampon: solution de composition adéquate pour le bon fonctionnement de
l'enzyme (Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 1.5mM, KCl 50mM, pH 8.3).

7. La PCR: Polymerase Chain Reaction

7.2.Principe de la PCR

Le matériel:

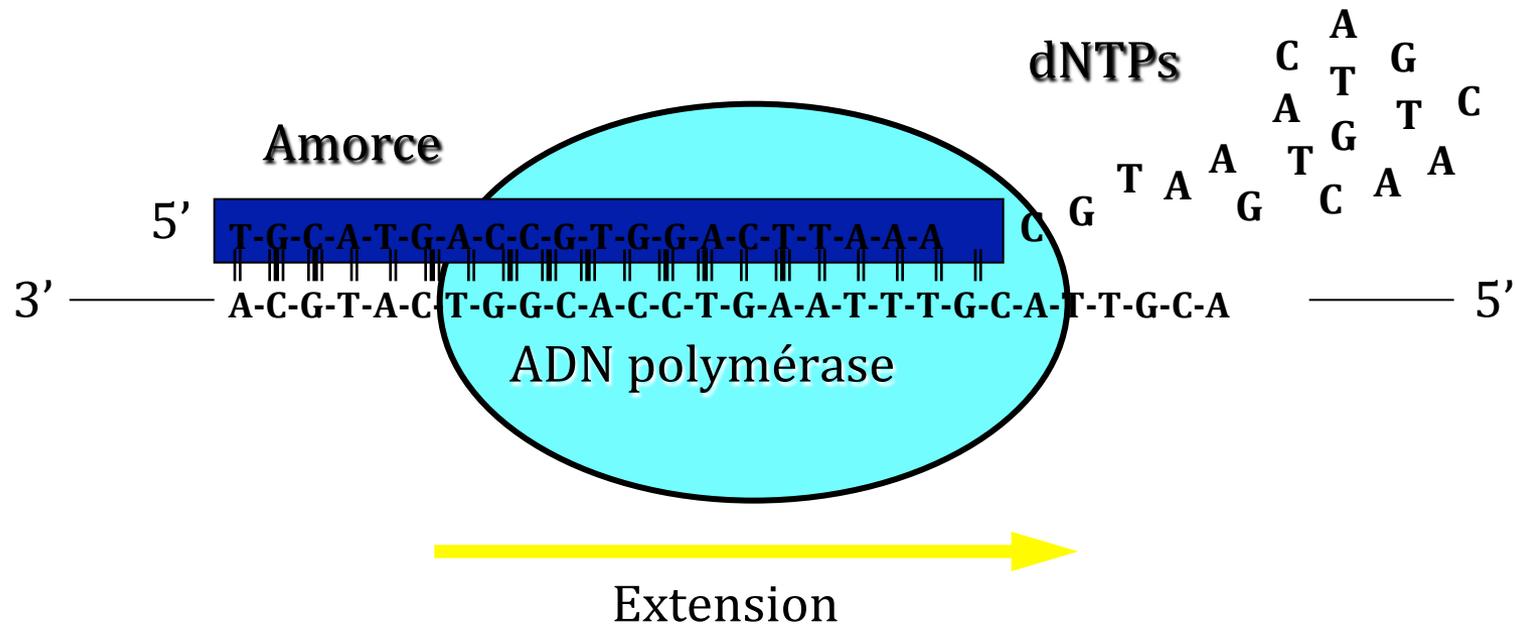


- ✓ **Thermocycleur:**
Machine automatisée qui contrôle les changements des températures indispensables pour chaque étape de la PCR:
 - Température de Dénaturation
 - Température d'Hybridation
 - Température d'Elongation

7. La PCR: Polymerase Chain Reaction

7.2.Principe de la PCR

Le scénario:



7. La PCR: Polymerase Chain Reaction

7.3. Etapes de la PCR

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

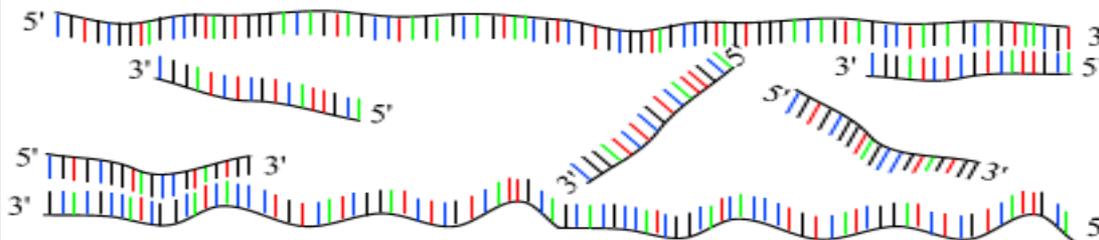
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

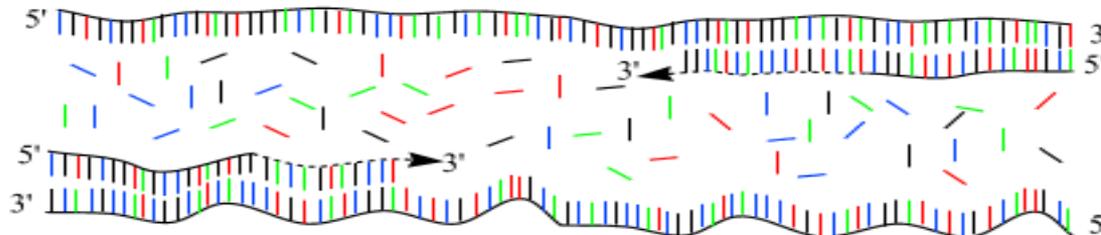
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

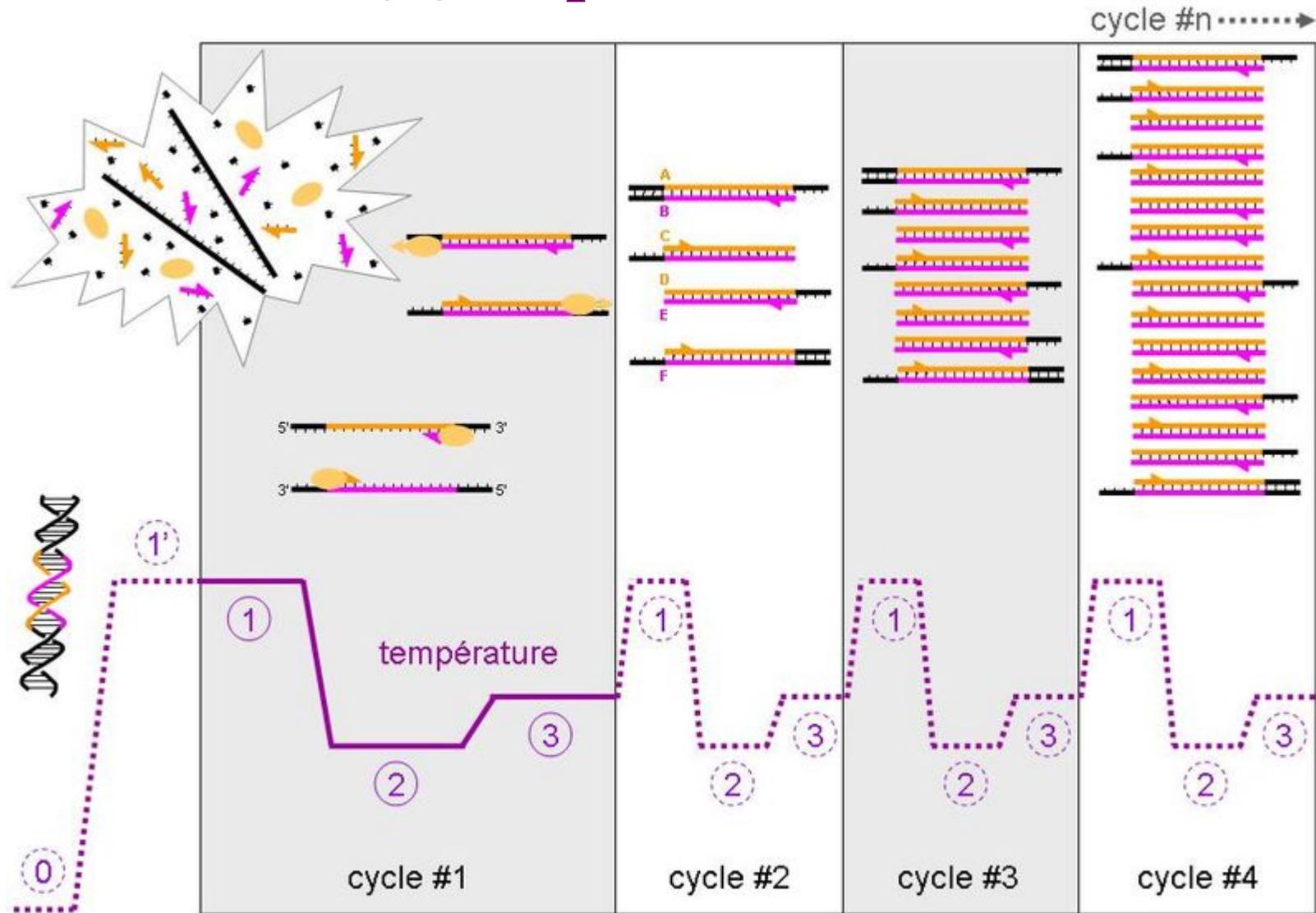
2 minutes 72 °C

only dNTP's



7. La PCR: Polymerase Chain Reaction

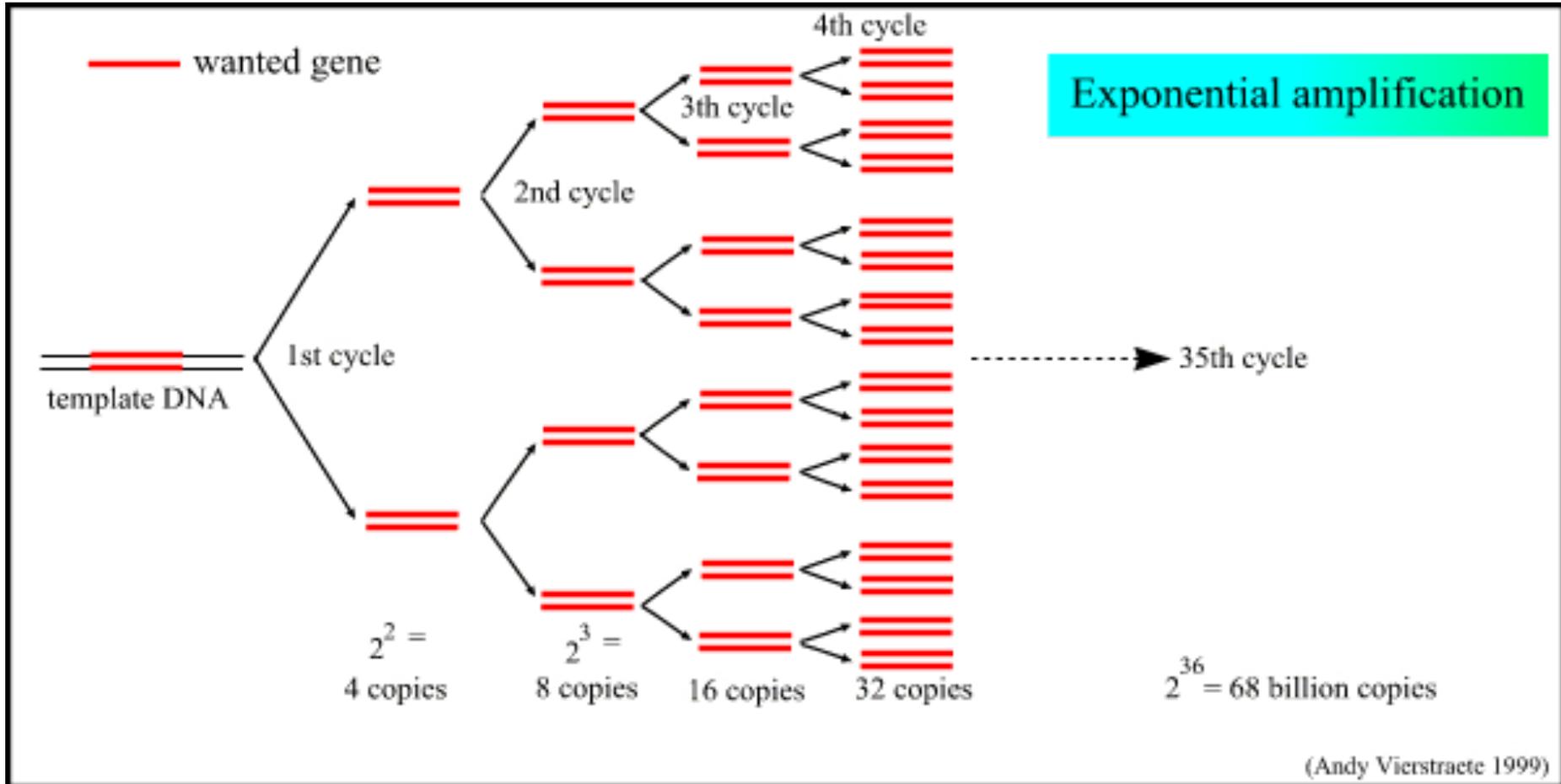
7.3. Etapes de la PCR



1: 94°C: dénaturation 2: 55°C: hybridation 3: 72°C: polymérisation

7. La PCR: Polymerase Chain Reaction

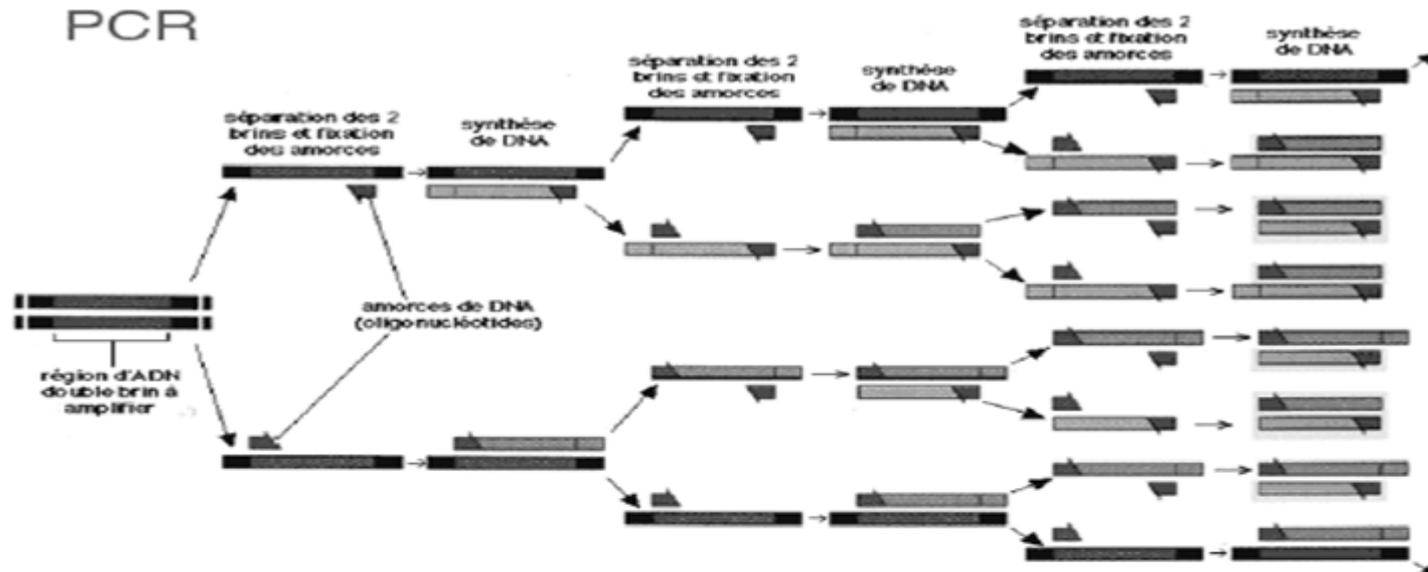
7.3. Etapes de la PCR



LE PRINCIPE ET LES ETAPES DE LA PCR EN DETAIL

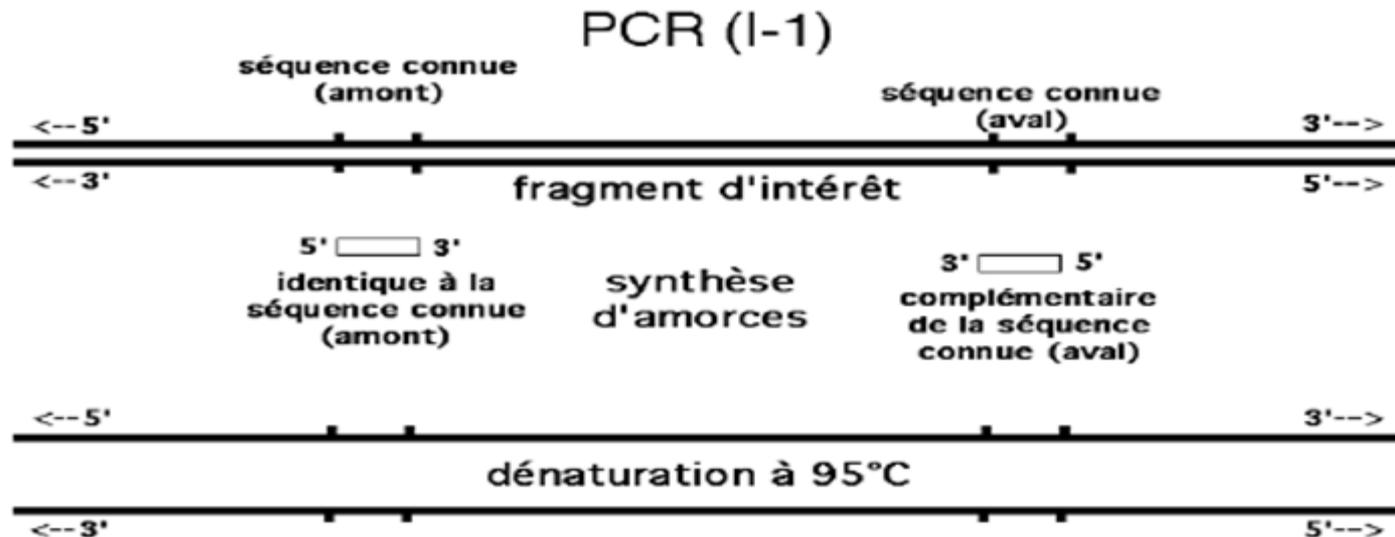
(Planches complémentaires)

1/10



BG 53

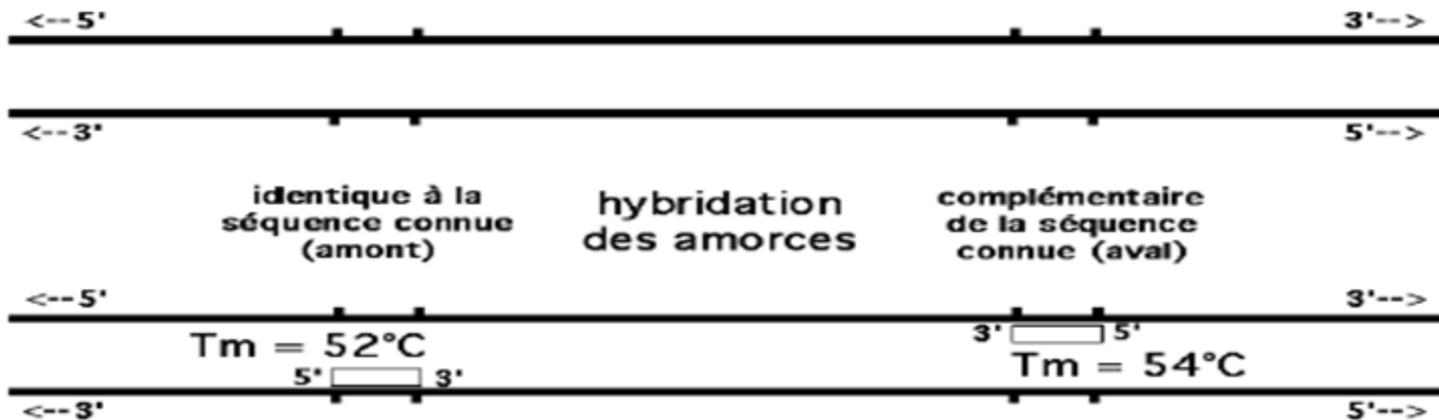
- La PCR (*polymerase chain reaction*) permet d'amplifier spécifiquement une région de DNA double brin de quelques centaines de paires de bases. Ce DNA doit d'abord être séparé en simples brins (dénaturation à 95°C).
- On ajoute au DNA de départ une large quantité d'amorces (oligonucléotides synthétiques complémentaires des deux extrémités de la région à amplifier) qui vont s'hybrider à 50-60°C environ avec la séquence complémentaire sur chacun des brins de DNA, et les quatre dNTP qui serviront de substrats.
- On soumet le tout à l'activité d'une DNA polymérase (Taq polymérase) qui synthétise à 72°C un brin complémentaire à partir du 3'OH de l'amorce hybridée. On obtient quatre brins de DNA.
- On recommence à dénaturer ces 4 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 8 brins de DNA.
- On recommence à dénaturer ces 8 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 16 brins de DNA.
- Et ainsi de suite 30 à 40 fois, ce qui aboutit à 34359738368 brins de DNA (34 milliards), ce qui représente une quantité suffisante pour étudier le fragment de DNA amplifié.



BG 53/1

- La PCR (*polymerase chain reaction*) est destinée à synthétiser un grand nombre de fragments d'ADN identiques à un fragment d'intérêt afin de pouvoir le caractériser. Ce fragment à multiplier est situé dans un ADN génomique ou dans un cDNA. Il est indispensable que soient connues les séquences aussi exactes que possible de deux petits oligonucléotides (20 à 30 nt) situés aux deux extrémités du fragment d'intérêt (côté 5' ou amont ; côté 3' ou aval).
- On synthétise ces oligonucléotides pour servir d'amorces à la réaction. L'amorce côté 5' est identique à la séquence connue en amont. L'amorce côté 3' est antiparallèle et complémentaire de la séquence connue en aval, c'est à dire identique à celle de l'autre brin à ce niveau.
- Pour commencer la réaction on dénature l'ADN en le chauffant à 95° plusieurs minutes, pour séparer les deux brins.

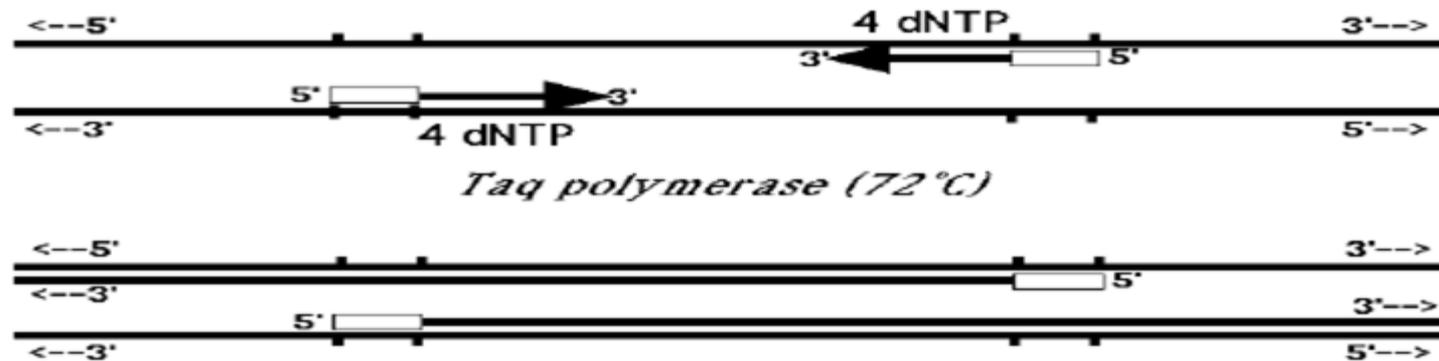
PCR (1-2)



BG 53/2

- Chacune des amorces amont et aval est complémentaire d'une séquence connue et on peut déterminer la T_m de leur hybridation : ici, 52°C pour la séquence amont et 54°C pour la séquence aval.
- En refroidissant la température vers 50°C (un peu en-dessous des T_m des deux amorces) les fragments d'ADN dénaturé vont pouvoir s'hybrider avec des séquences complémentaires. La concentration des amorces étant beaucoup plus élevée que celle des brins d'ADN, chaque brin d'ADN s'hybridera avec une amorce qui lui est complémentaire.
- Ainsi le brin du bas, orienté $5' \rightarrow 3'$ de droite à gauche, s'hybridera avec l'amorce amont, orientée $5' \rightarrow 3'$ de gauche à droite et le brin du haut, orienté $5' \rightarrow 3'$ de gauche à droite, s'hybridera avec l'amorce aval, orientée $5' \rightarrow 3'$ de droite à gauche.

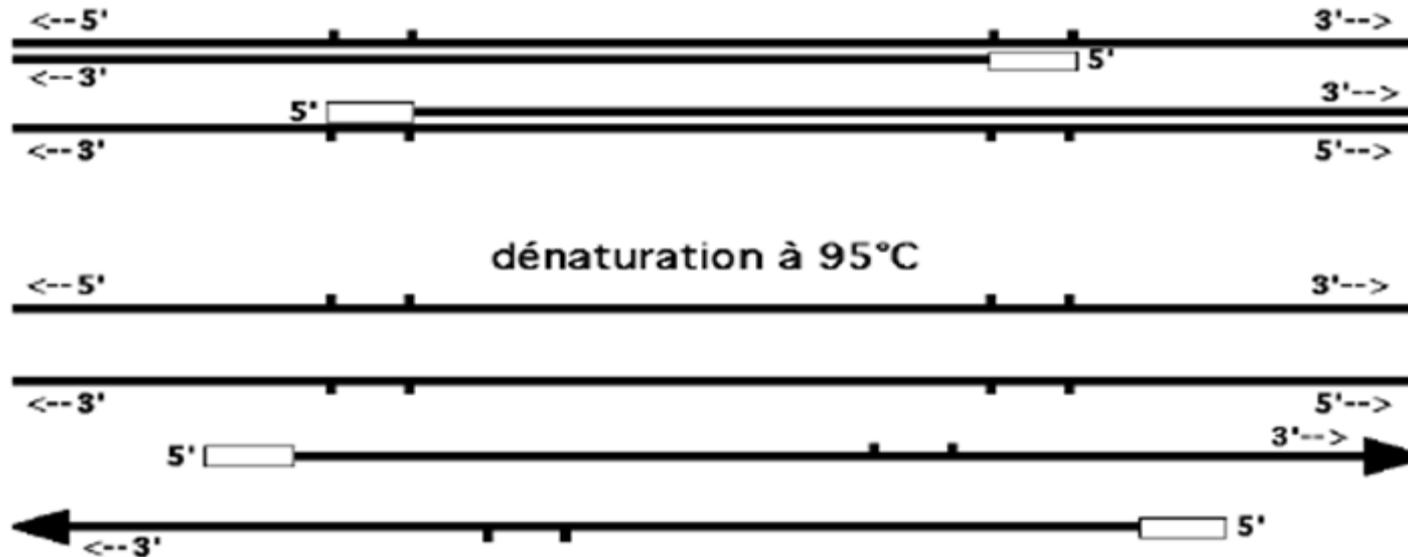
PCR (I-3)



BG 53/3

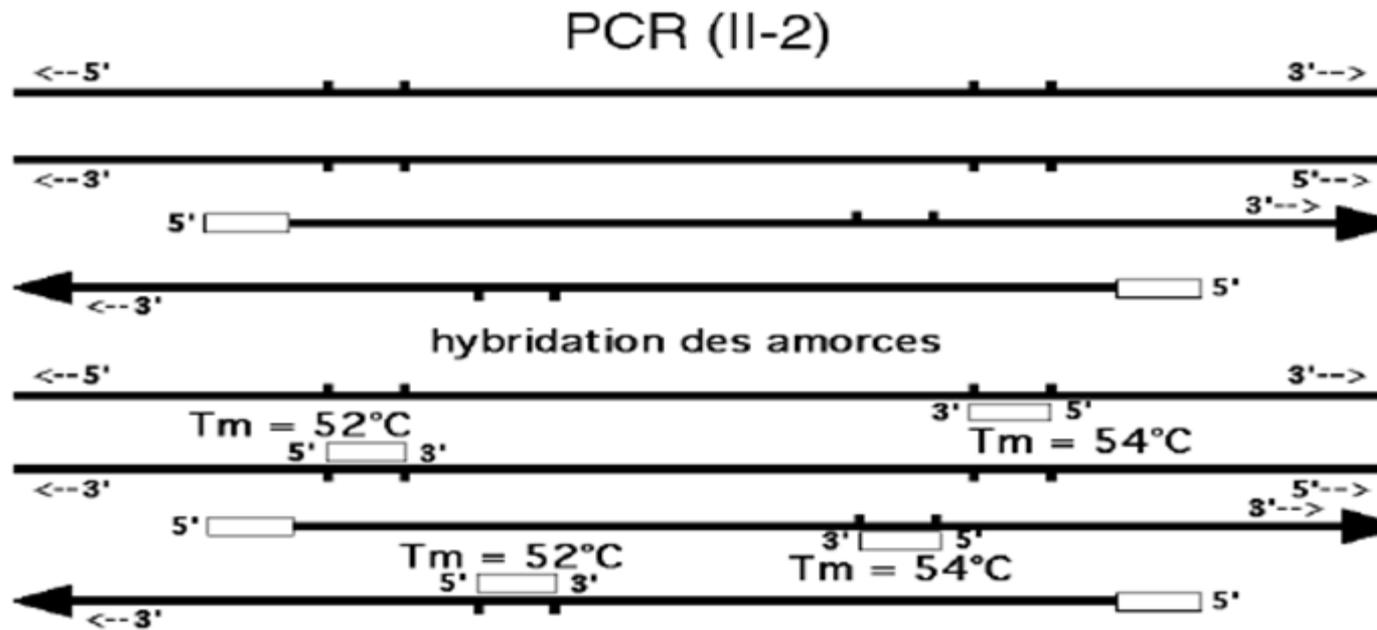
- A 95°C durant la phase de dénaturation, puis à 50° C durant la phase d'hybridation, la Taq polymérase était inactive parce que trop éloignée de sa température optimale d'activité (75 à 80°C).
- En remontant la température à 72°C, l'enzyme commence son activité. Comme toutes les DNA polymérases elle nécessite un ADN double brin avec une extrémité 3'OH rentrante pour initier la polycondensation des désoxyribonucléotides, elle lit le brin modèle de 3' vers 5' et elle construit le nouveau brin de 5' vers 3' qui se prolonge autant qu'il existe un brin complémentaire pour servir de modèle.
- Le nouveau brin d'ADN est formé à partir de l'amorce amont (côté 5') et se prolonge vers la droite (côté 3'). L'autre brin d'ADN est formé à partir de l'amorce aval (côté 5') et se prolonge vers la gauche (côté 3'). La synthèse n'est limitée que par le temps d'incubation (environ 1000 nucléotides par minute).

PCR (II-1)



BG 53/4

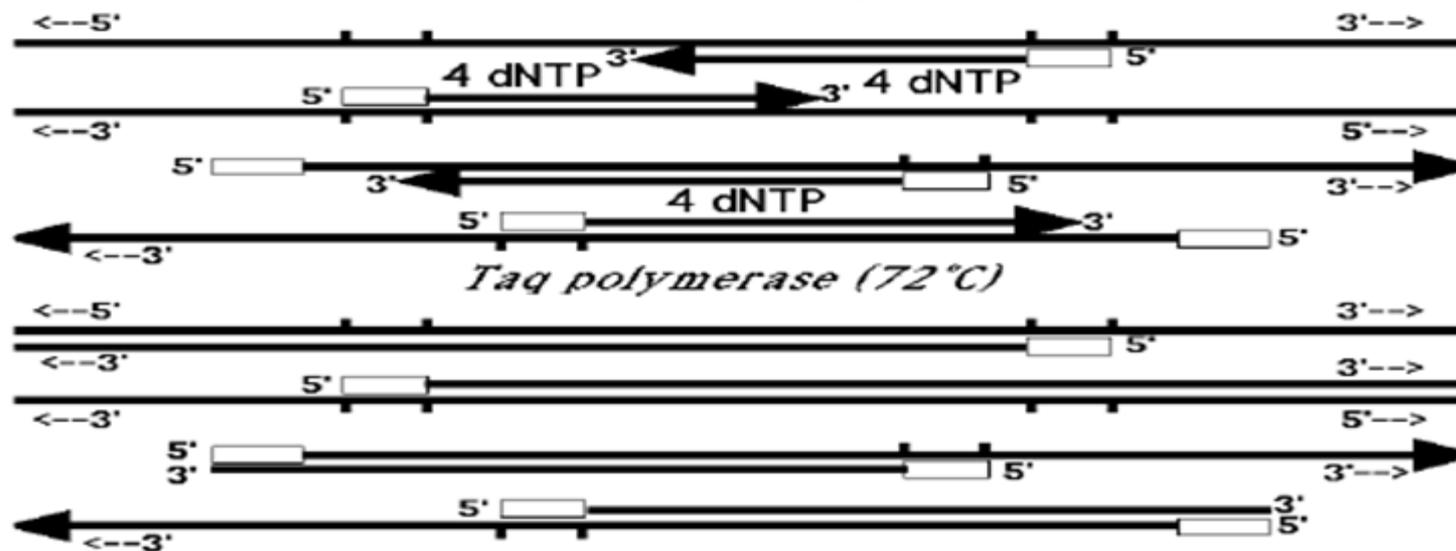
- Au cours de la phase d'élongation chacun des brins du fragment d'intérêt a été répliqué une fois, la nombre de copies a donc doublé.
- Le deuxième cycle commence par la phase de dénaturation pendant laquelle on dénature à nouveau l'ADN en le chauffant à 95° plusieurs minutes, pour séparer les deux brins d'origine des brins nouvellement synthétisés.



BG 53/5

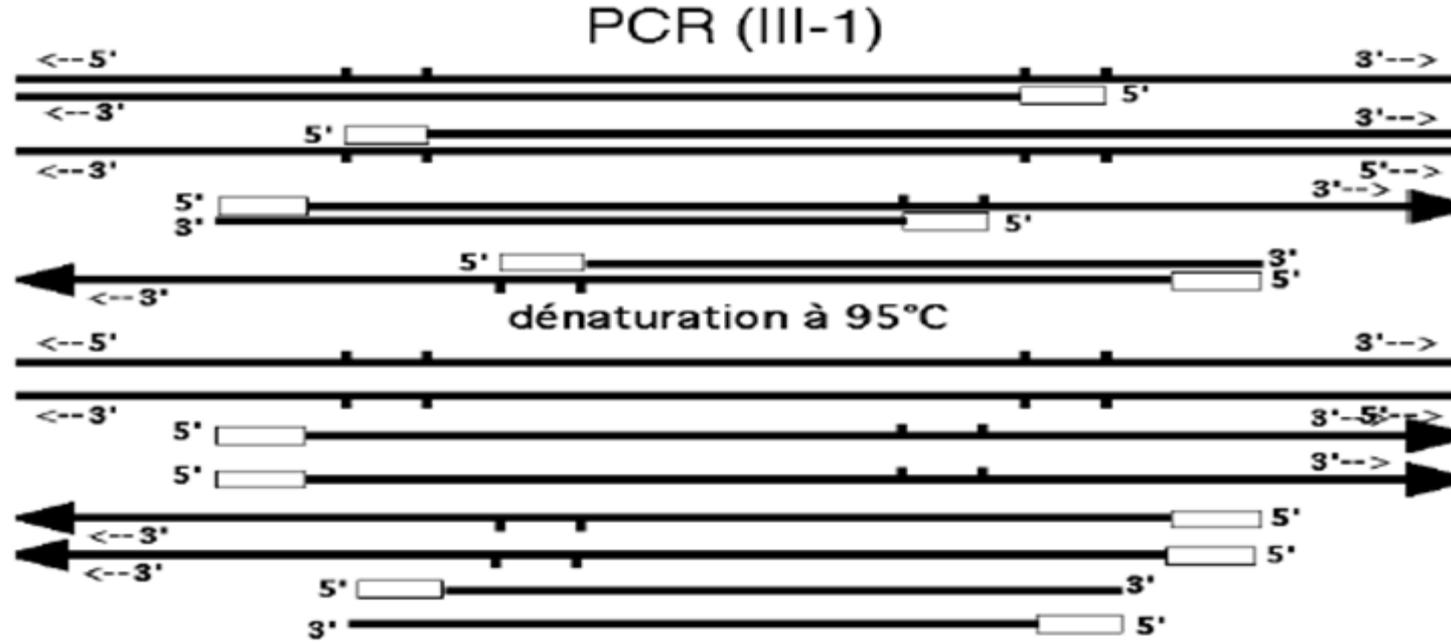
- Les brins d'ADN nouvellement synthétisés ont répliqué le fragment d'intérêt et aussi la séquence complémentaire de l'amorce qui le suit.
- En refroidissant la température vers 50°C (un peu en-dessous des T_m des deux amorces) les fragments d'ADN dénaturé et les fragments d'ADN nouvellement synthétisés vont pouvoir s'hybrider à nouveau avec les amorces.
- Ainsi les brins orientés $5' \rightarrow 3'$ de droite à gauche s'hybrideront avec l'amorce amont, orientée $5' \rightarrow 3'$ de gauche à droite et les brins orientés $5' \rightarrow 3'$ de gauche à droite s'hybrideront avec l'amorce aval, orientée $5' \rightarrow 3'$ de droite à gauche.

PCR (II-3)



BG 53/6

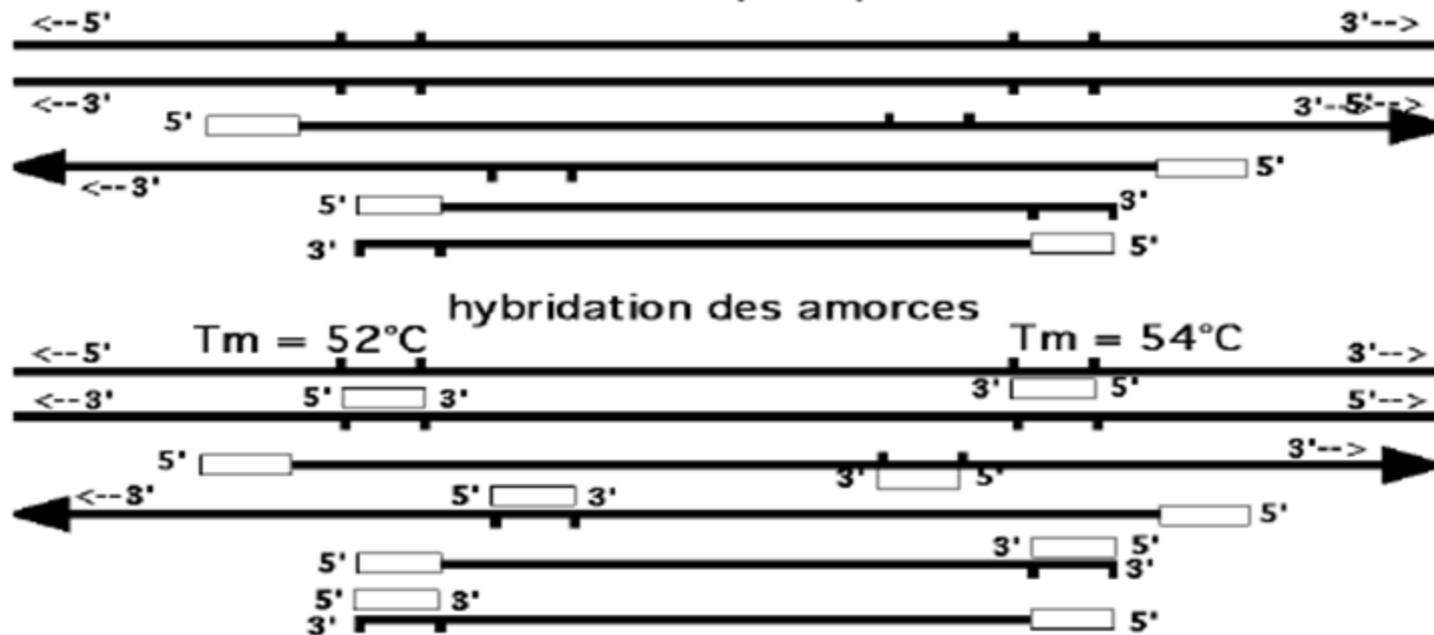
- La Taq polymérase, thermorésistante, a été inactivée mais pas dénaturée durant la phase de dénaturation de l'ADN.
- En remontant la température à 72°C, l'enzyme recommence donc son activité. Elle catalyse la polycondensation des désoxyribonucléotides, qui se prolonge autant qu'il existe un brin complémentaire pour servir de modèle.
- Le nouveau brin d'ADN formé à partir de l'amorce amont (côté 5') et se prolonge vers la droite (côté 3'). L'autre brin d'ADN formé à partir de l'amorce aval (côté 5') et se prolonge vers la gauche (côté 3'). Sur les brins d'ADN (en jaune) synthétisés à partir des amorces au cycle précédent, la synthèse sera limitée au côté 5' de l'amorce opposée, faute de modèle pour poursuivre. Seul le fragment d'intérêt sera répliqué sur ces nouveaux fragments.



BG 53/7

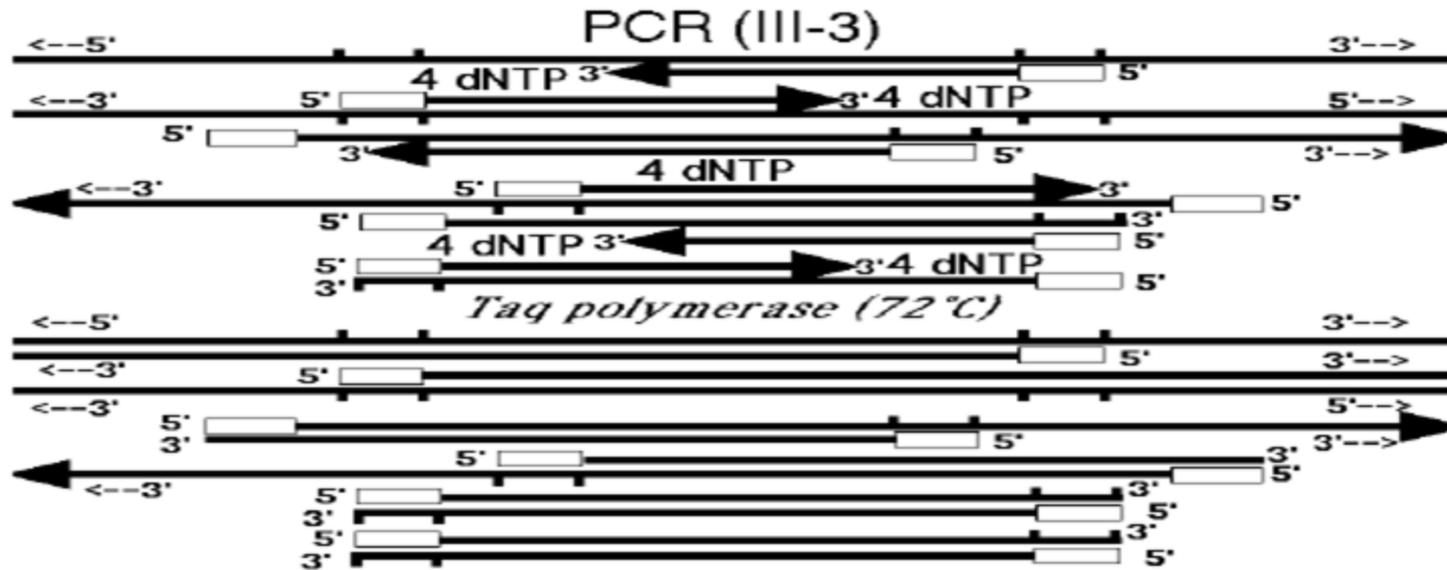
- Au cours de la précédente phase d'élongation chacun des brins d'ADN contenant la séquence du fragment d'intérêt a été répliqué une fois, le nombre de copies a donc encore doublé. A chaque cycle ce nombre doublera à nouveau et l'amplification se poursuit comme la suite des puissances de 2 : 2^2 , 2^3 , 2^4 , 2^5 , 2^6 , 2^7 , ... à la fin du 35^{ème} cycle, il y aura 2^{35} copies soit plus de 34 milliards de copies !
- Le cycle suivant commence par la phase de dénaturation pendant laquelle on dénature à nouveau l'ADN en le chauffant à 95° plusieurs minutes. A ce stade, il reste encore les deux ADN de départ, quelques ADN limités par une seule des séquences amorce et les séquences, de plus en plus nombreuses, limitées par les séquences des deux amorces.

PCR (III-2)



BG 53/8

- En refroidissant la température vers 50°C (un peu en-dessous des T_m des deux amorces) les fragments d'ADN dénaturé et les fragments d'ADN nouvellement synthétisés vont pouvoir s'hybrider à nouveau avec les amorces.
- Ainsi les brins orientés 5' → 3' de droite à gauche s'hybrideront avec l'amorce amont, orientée 5' → 3' de gauche à droite et les brins orientés 5' → 3' de gauche à droite s'hybrideront avec l'amorce aval, orientée 5' → 3' de droite à gauche.



BG 53/9

- En remontant la température à 72°C, l'enzyme recommence encore son activité. Elle catalyse la polycondensation des désoxyribonucléotides, qui se prolonge autant qu'il existe un brin complémentaire pour servir de modèle.
- Le nouveau brin d'ADN formé à partir de l'amorce amont (côté 5') et se prolonge vers la droite (côté 3'). L'autre brin d'ADN formé à partir de l'amorce aval (côté 5') et se prolonge vers la gauche (côté 3'). Sur les brins d'ADN (en jaune) synthétisés à partir des amorces au cycle précédent, la synthèse sera limitée au côté 5' de l'amorce opposée, faute de modèle pour poursuivre. Seul le fragment d'intérêt sera répliqué sur ces nouveaux fragments.
- Le nombre de copies de l'ADN d'origine avec une seule amorce-limite va continuer à croître arithmétiquement et le nombre de copies avec deux amorces-limites continuera à croître exponentiellement, jusqu'à ce que ces dernières, soient pratiquement pures dans l'ADN amplifié final.