

# **Génie Génétique**

# **Contenu de la matière :**

**Chapitre I. Enzymes de restriction et de modification  
des acides nucléiques**

**Chapitre II. Hôtes de clonage**

**Chapitre III. Vecteurs de clonage**

**Chapitre IV. Techniques de biologie moléculaire**

# **Génie Génétique**

## **Chapitre IV.**

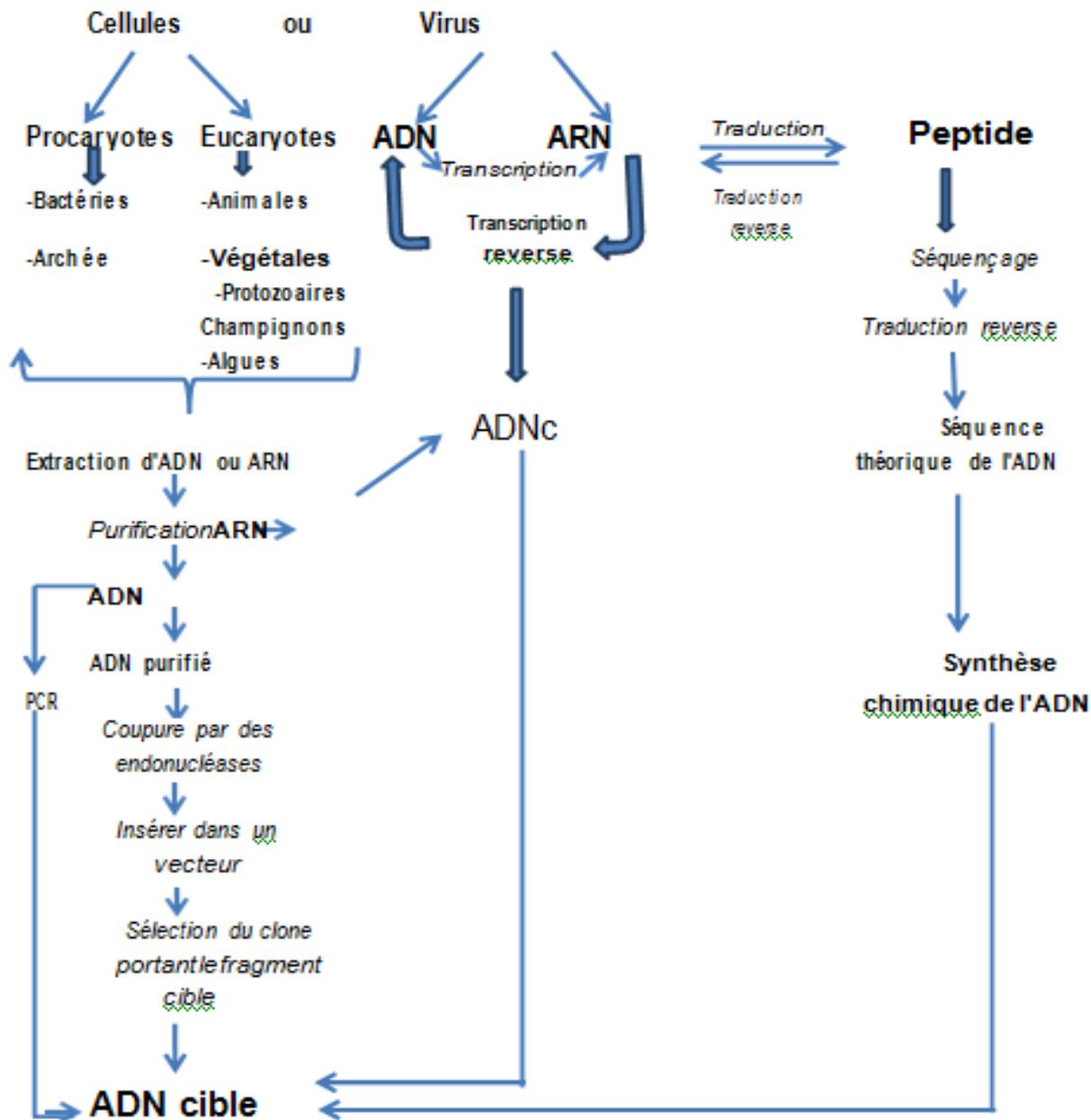
### **Techniques de biologie moléculaire**

L'étude des processus génétiques nécessite un grand nombre de techniques expérimentales.

Cela consiste à utiliser des méthodes pour l'extraction, la purification, la séparation, restriction, l'amplification, le séquençage ...etc des acides nucléiques.

On va voir dans cette partie:

- ❖ l'extraction et la purification de l'ADN.
- ❖ la visualisation de l'ADN sur gel d'agarose.
- ❖ l'hybridation du principe jusqu'au la détection des clones spécifiques.
- ❖ l'amplification de l'ADN par PCR.
- ❖ le séquençage de l'ADN
- ❖ et en fin la synthèse de l'ADNc.



**Fig.1:** Carte de conception: Sources d'ADN

## 1-2- Préparation de l'ADN à partir du sang total

Les globules blancs (lymphocytes, macrophages...etc.) représentent la source majeure d'ADN en médecine.

A partir de 10 à 30 ml de sang en présence d'un **anticoagulant** (ex. EDTA), il est possible de récupérer **une quantité d'ADN ( $\approx 100\mu\text{g}$ )** suffisante, pour des études **qualitatives et quantitatives**.

## 1-2-1- Protocole expérimental

- 1- **Prélèvement** de 10 à 30 ml de sang dans un tube contenant **un anticoagulant** (ex. EDTA).
  - 2- **Éclatement** des globules rouges par **une solution hypotonique**
  - 3- **Récupération** des globules blancs par **centrifugation**.
  - 4- **Préparation du lysat** cellulaire en utilisant la solution de lyse (**détergent comme le SDS ou sarcosyl + Protéinase K**).
- Cette étape **permet la libération de l'ADN nucléaire** dans le milieu et la digestion des protéines qui lui étaient associées.
- 5- **Extraction phénolique** : cette étape permet **de récupérer l'ADN dans la phase aqueuse après la centrifugation**, les acides nucléiques ne sont pas solubles dans le phénol, il élimine les protéines.
  - 6- **Extraction au chloroforme ou à l'éther** : cette étape complète toujours une extraction phénolique, car elle **permet d'éliminer les traces de phénol qui aurait pu être importé par la phase aqueuse** (le phénol peut inhiber les enzymes utilisées dans l'amplification, la restriction...etc.).

**7-Précipitation** : cette étape permet la précipitation de l'ADN pour faciliter sa récupération. Il y'a deux types largement utilisés :

**a.Précipitation à l'alcool éthylique** : Elle doit être effectuée à haute force ionique (2.5 volumes d'éthanol 95° contre un volume d'échantillon). Pour les faibles concentrations, il faut prolonger le temps de précipitation (> 10h), comme il est possible d'accélérer la précipitation par le froid (-20°C à -70°C). **L'ADN est récupéré par centrifugation.**

**b.Précipitation à l'isopropanol** : Le principe est le même que la précipitation éthanolique. Ce type de précipitation se fait **volume à volume**. Mais deux caractéristiques majeures la différentient de la précipitation éthanolique.

**-Le sel n'est pas nécessaire**

**-Les très petits fragments de DNA même à hautes concentrations ne sont pas précipités, ce qui permet de les éliminer.**

**8-Lavage** : l'utilisation de l'éthanol 70° permet **d'éliminer les sels, et les traces de l'isopropanol**. L'ADN est récupéré par centrifugation.

**9- Séchage**: cette étape permet l'élimination de l'éthanol (s'évapore).

**10- Resuspendre** dans 10mM tris EDTA, l'eau purifiée de nucléases...etc.

## 1-2-2- Dosage des acides nucléiques

Les pyrimidines et les purines absorbent fortement les UV à 260nm.

Une unité de densité optique à 260 nm correspond à:

Une solution de DNA double brin à 50µg/ml,

Une solution de DNA simple brin ou RNA à 25µg/ml.

Pour vérifier la pureté de l'ADN il faut calculer :

$$P \text{ (pureté)} = A_{260} / A_{280}$$

Une solution d'ADN est considérée pure si :  $1.7 \leq P \leq 2$

## 2-Electrophorèse

C'est **une technique de bioséparation** permettant la séparation des biomolécules selon leur charge et leur taille (ADN, ARN, protéines).

Les acides nucléiques en solution portent **une charge négative** à cause de l'ionisation de **leurs groupements phosphate**.

Ils se déplacent donc vers **l'électrode (+)**.

Deux sortes de matrice de gel sont utilisées: **l'agarose et le polyacrylamide.**

Le gel agit à la manière d'un **tamis moléculaire** au travers duquel les molécules d'ADN en mouvement doivent passer; les molécules de grande taille ont plus de difficulté pour passer à travers les mailles (pores) créés par le réseau des microfibrilles du gel et vont donc migrer plus lentement que les petites molécules.

La vitesse de migration de l'ADN est influencée par deux paramètres :

- **La masse moléculaire** (nombre de pb)
- **La concentration du gel.**

Il faut noter que la nature et la concentration du support de l'électrophorèse sont en fonction de la taille des fragments à séparer.

On utilise généralement un gel 1 % m/V (1 g d'agarose pour 100 ml de volume final) en électrophorèse. Plus on veut un gel discriminant, plus on augmentera le pourcentage d'agarose.

L'agarose est un polymère à base d'agar purifié.

Différentes puretés d'agarose sont disponibles auprès des fournisseurs.

En général, de l'agarose de grande pureté à la solidification lente est utilisé lorsque l'ADN doit être extrait du gel après migration.

## Tampons

Il existe un nombre très varié de tampons. Les plus souvent utilisés sont le **Tris/Acétate/EDTA (TAE)**, le **Tris/Borate/EDTA (TBE)** et le **sodium borate (SB)**.

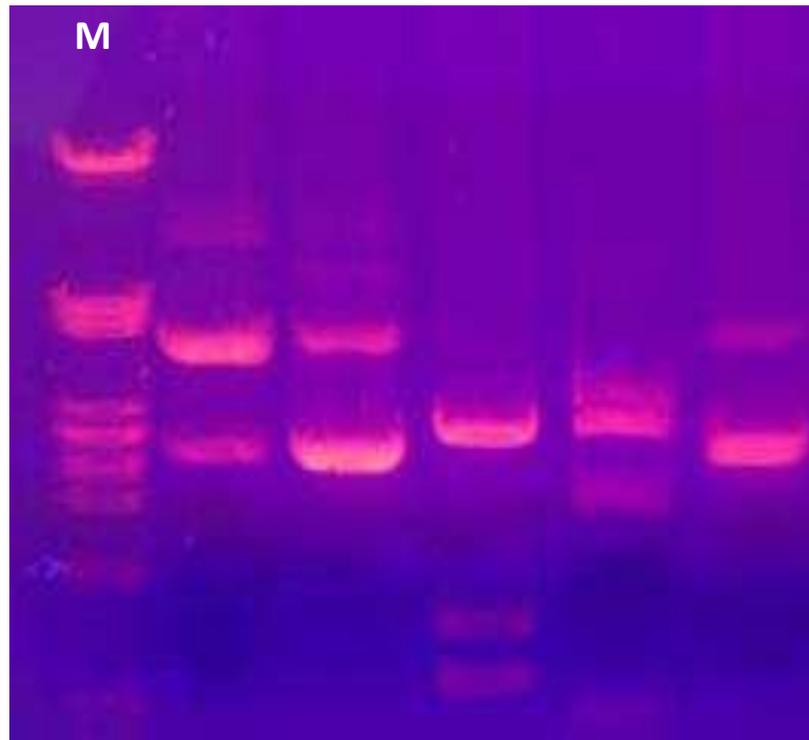
Le **TAE** possède le plus faible pouvoir tampon mais produit une meilleure séparation pour les fragments d'ADN de grande taille.

Le **SB** est relativement nouveau et inefficace pour la séparation de fragments d'ADN d'une taille supérieure à 5000 **paires de bases (5 kb)**. Cependant sa faible conductivité permet l'utilisation d'un **plus fort voltage (jusqu'à 35V/cm)**, ceci **réduisant** le temps de migration.

Dans toutes les électrophorèses, des marqueurs de taille (ou de poids moléculaire) sont **déposés et migrent parallèlement au DNA étudié**.

Une fois l'électrophorèse terminée, les molécules fluorophores, comme le bromure d'éthidium, qui se fixe à l'ADN en **s'intercalant entre les bases**.

Les bandes d'ADN (regroupent toute les molécules d'ADN de taille identique) sont visualisées sous UV.



**Fig.2:** Visualisation des bandes d'ADN sous UV. **M:** marqueur de taille.

## Exemples de marqueurs de taille

Phage  $\lambda$  coupé par *Bst*EII (0.12à8.45)

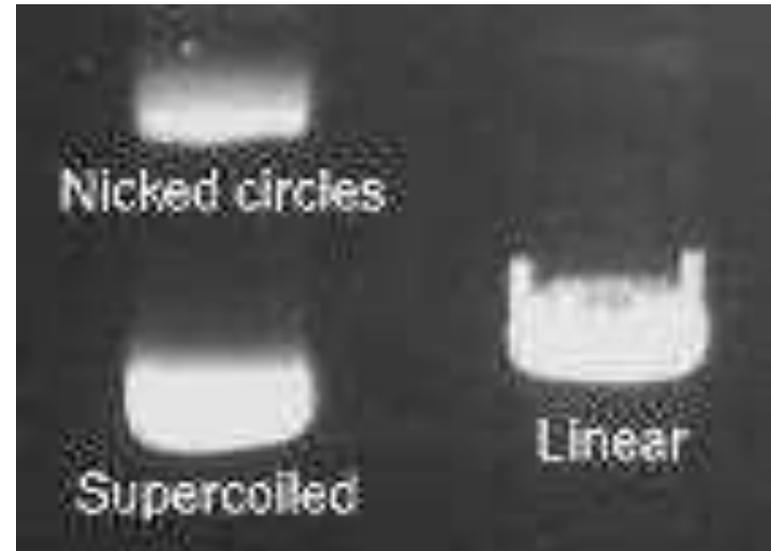
Phage  $\lambda$  coupé par *Hind*III (0.13à23.13)

pBR322 coupé par *Bst*NI (0.12 à 1.86)

100 pb Ladder (100à1000)

**Les topoisomères d'ADN** (ont la même taille, mais dont les degrés de liaison sont différents) migrent différemment (fig. 4).

**Fig.4:** Migration des topoisomères d'ADN (circulaire relâché; linéaire, et surenroulé) sur gel d'agarose



### 3. Hybridation des acides nucléiques

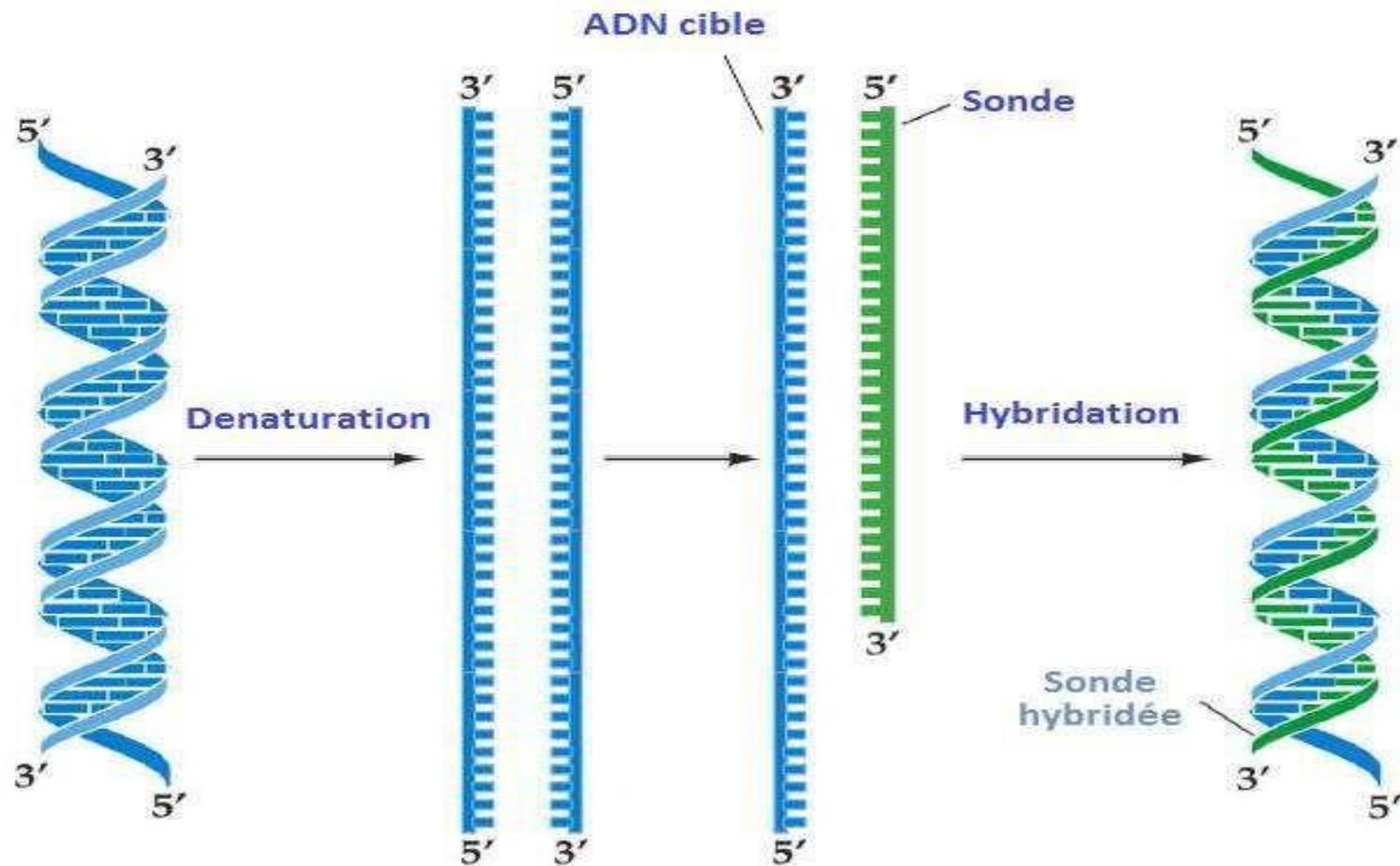
Il est possible d'apparier des brins d'ADN ou ARN avec des oligonucléotides qui reconnaissent spécifiquement des séquences sur les brins d'ADN de manière antiparallèle et complémentaire.

Ces oligonucléotides sont appelés **sondes nucléiques** (fig. 5).

Pour le cas de deux brins complémentaires de la même molécule d'ADN (brins homologues) on parle de **renaturation** (hybridation à 100%).

Chaque 1% de non homologie diminue la température d'hybridation ( $T_h$ ) de 1°C.

L'hybridation moléculaire est utilisée surtout dans **la détection de l'homologie entre les molécules d'ADN de sources différentes**. La complémentarité dépendra de la spécificité et de la sensibilité.



**Fig.5:** Hybridation des acides nucléiques (Passarge, 2007).

La  $T_h$  est estimée en utilisant plusieurs formules, cela dépend de la:

- Longueur du fragment (nombres de nucléotides).
- Composition du milieu
- Mis-appariement
- Le contenu en C+G

## 3-1 Facteurs influençant l'hybridation

La concentration de l'ADN et le temps d'hybridation

La température d'hybridation

La force ionique

La complexité des séquences

## 3-2-Types d'hybridation

L'objectif de l'hybridation est **la détection** de la présence d'un acide nucléique **d'une séquence donnée** par l'utilisation d'un fragment d'AND complémentaire = sonde.

Cela peut avoir lieu en solution ou **sur support solide** (immobilisation de la cible sur une membrane [**nitrocellulose, nylon**], **sur verre**, colonies bactériennes, chromosomes, plage de lyse...etc.).

### **3-2-1-Hybridation d'ADN sur support solide : Southern blot**

La procédure de ce type d'hybridation est résumée en sept étapes (fig. 6)

1– Extraction de l'ADN

2– Digestion enzymatique (par les enzymes de restriction)

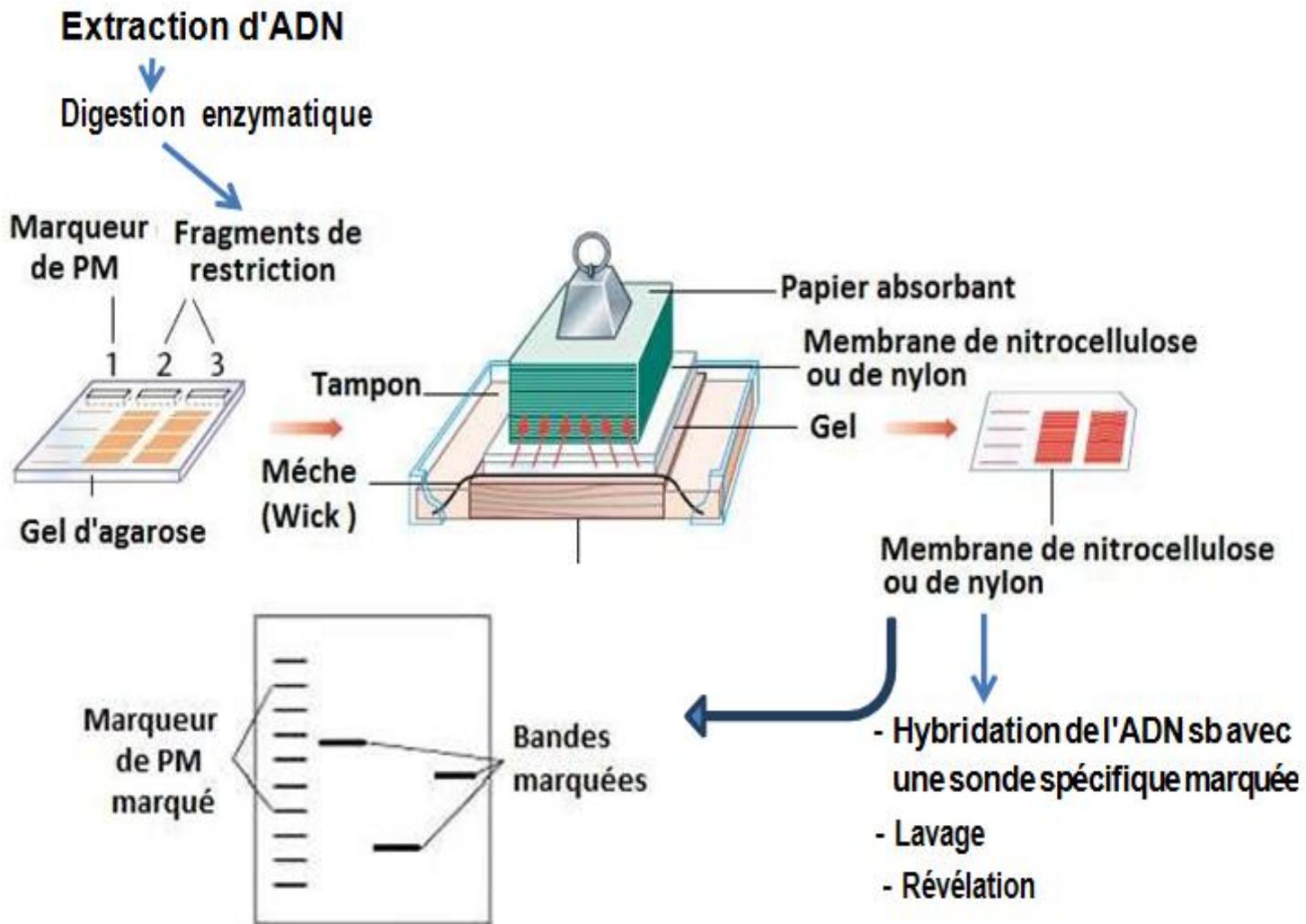
3– Electrophorèse du produit de la digestion

4– Transfert sur membrane

5– Hybridation avec une sonde spécifique marquée.

6– Lavages

7– Révélation



**Fig.6:** Southern Blot.

On peut aussi révéler la présence des séquences spécifiques dans les **ARN (Northern Blot)** et des **protéines (Western Blot)** utilisant le même principe.

## 4-Réaction de Polymérisation en Chaîne "PCR"

La synthèse et le séquençage d'ADN ont permis l'émergence d'une méthode d'amplification de l'ADN appelée PCR (**Polymerase Chain Reaction**), à partir d'un gène (ou fragment) spécifique, de grand quantité d'ADN sont obtenues *in vitro*. L'ADN polymérase copiant jusqu'à un milliard de fois cette région cible « quantité suffisante pour être révélée ».

## 4-1- Etapes de PCR :

La dénaturation de la double hélice nécessite une haute température (autour de 95°C), donc l'enzyme utilisée doit être résistante aux hautes températures ou bien elle devait être ajoutée lors de chaque cycle.

Ce problème a été résolu en utilisant une ADN polymérase thermiquement stable d'une bactérie thermophile : *Thermus aquaticus*, isolée d'une source chaude.

Cette enzyme nommée **ADN Taq polymérase** est stable à 95°C (tab. 2) et n'est pas affectée par l'étape de dénaturation.

Avec l'utilisation du Taq polymérase, l'ADN étant copié à 72°C et non plus 37°C, **son utilisation augmente la spécificité de la PCR.** Car aux hautes températures l'hybridation non spécifique d'amorces à l'ADN **non cible est rare.** Les produits de l'ADN Taq polymérase sont donc plus homogènes que ceux obtenus avec l'ADN polymérase III d'*E. coli*. En résumé il y'a 3 étapes :

**Dénaturation** (autour de  $95^{\circ}\text{C}$ ) : Sert à dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin.

**Hybridation** (autour de  $T_h$   $50-68^{\circ}\text{C}$ ): Lors du refroidissement du mélange, les amorces étant en excès, la plupart des brins d'ADN cibles se fixent à celles et non entre eux.

**Elongation** ( $72^{\circ}\text{C}$ ) : L'ADN polymérase « prolonge les amorces : côté 3'-OH libre » en utilisant les brins cibles comme matrice.

Après une période appropriée d'incubation, le mélange est chauffé de nouveau pour séparer les brins. Il est alors refroidi pour que les amorces s'hybrident aux régions complémentaires de l'ADN nouvellement synthétisé. **Le processus complet est alors répété « cycle ».**

**Tab.2:** Les différences entre ADN Taq Polymérase et l'ADN polymérase III.

	ADN Taq polymérase	ADN polymérase III
Stabilité thermique à 95°C	+++	-
Activité exonucléase	-	+ (5' → 3')

L'ADN polymérase de l'hyper thermophile *Pyrococcus furiosus* (croissance optimale à 100°C, la bactérie a été isolée d'une source hydrothermale), appeler **Pfu polymérase**.

C'est la meilleure polymérase thermostable pour la correction des erreurs de réplication (Fidélité élevée) grâce à son activité **auto-correctrice**. Cette enzyme est très utilisée lorsqu'une haute précision est requise. **De plus elle est plus stable que la Taq polymérase.**

## 4-3 Thermocycleur

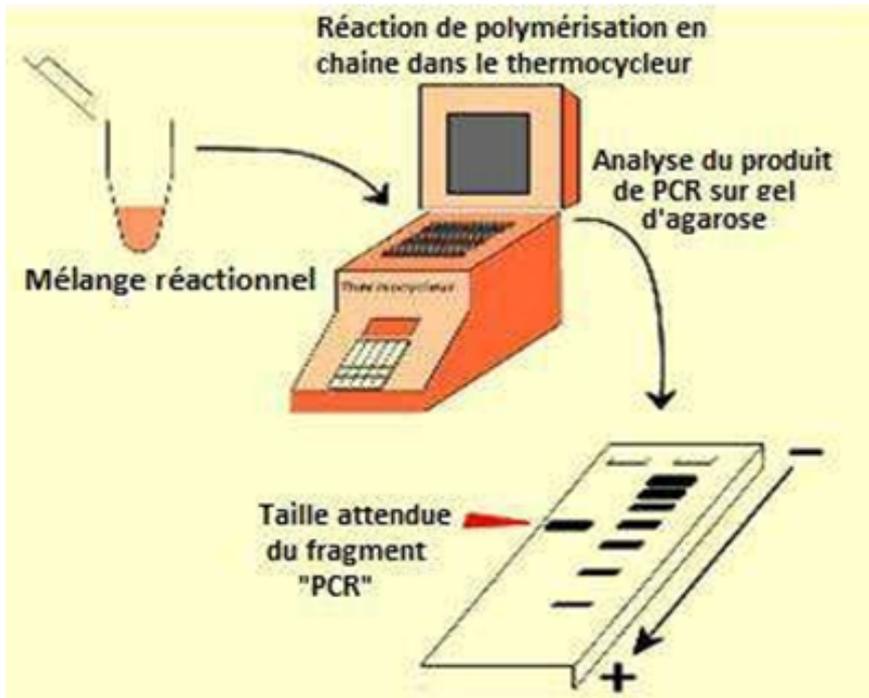
Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur (fig. 7). Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur (effectuer automatiquement les cycles de chauffage) (fig. 8).

Le secret de la PCR est que le produit d'un cycle d'extension sert de matrice pour le suivant (fig. 8), ainsi la technique PCR est remarquable par le fait que l'ADN cible se double à chaque cycle. En pratique 20 à 40 cycles sont habituellement réalisés, ils génèrent  $10^6$  à  $10^9$  fois la séquence cible. « Elle repose sur la succession de plusieurs cycles » (fig.9).

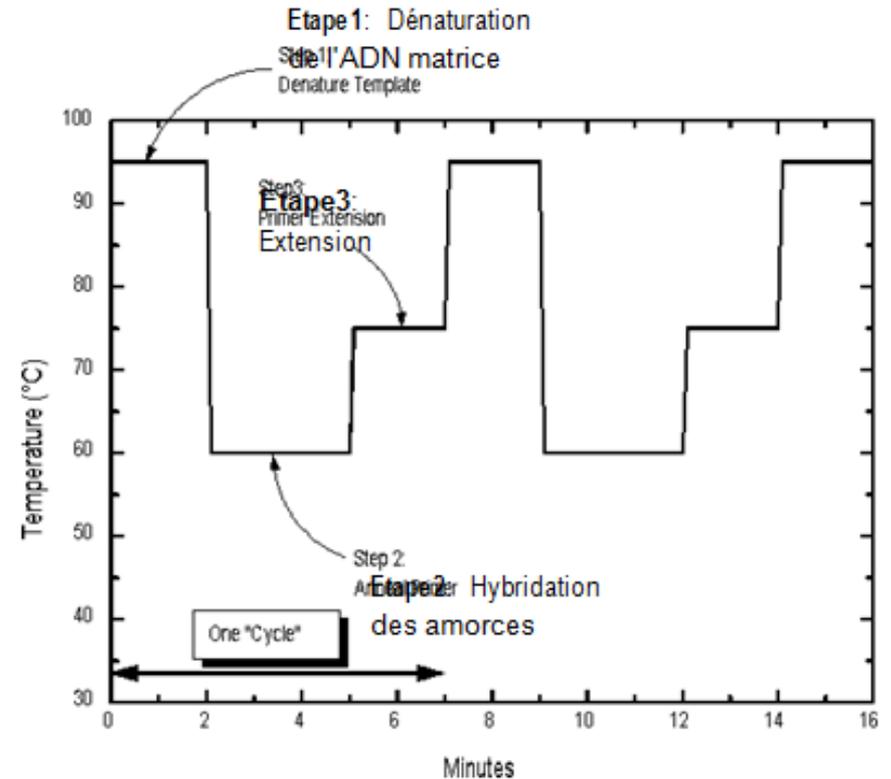
La progression géométrique de raison 2 (tab. 3) permet d'établir une relation pour calculer le nombre des copies totale et cibles.

**Tab. 3:** Progression géométrique de raison 2 des cycles de PCR et nombre de copies.

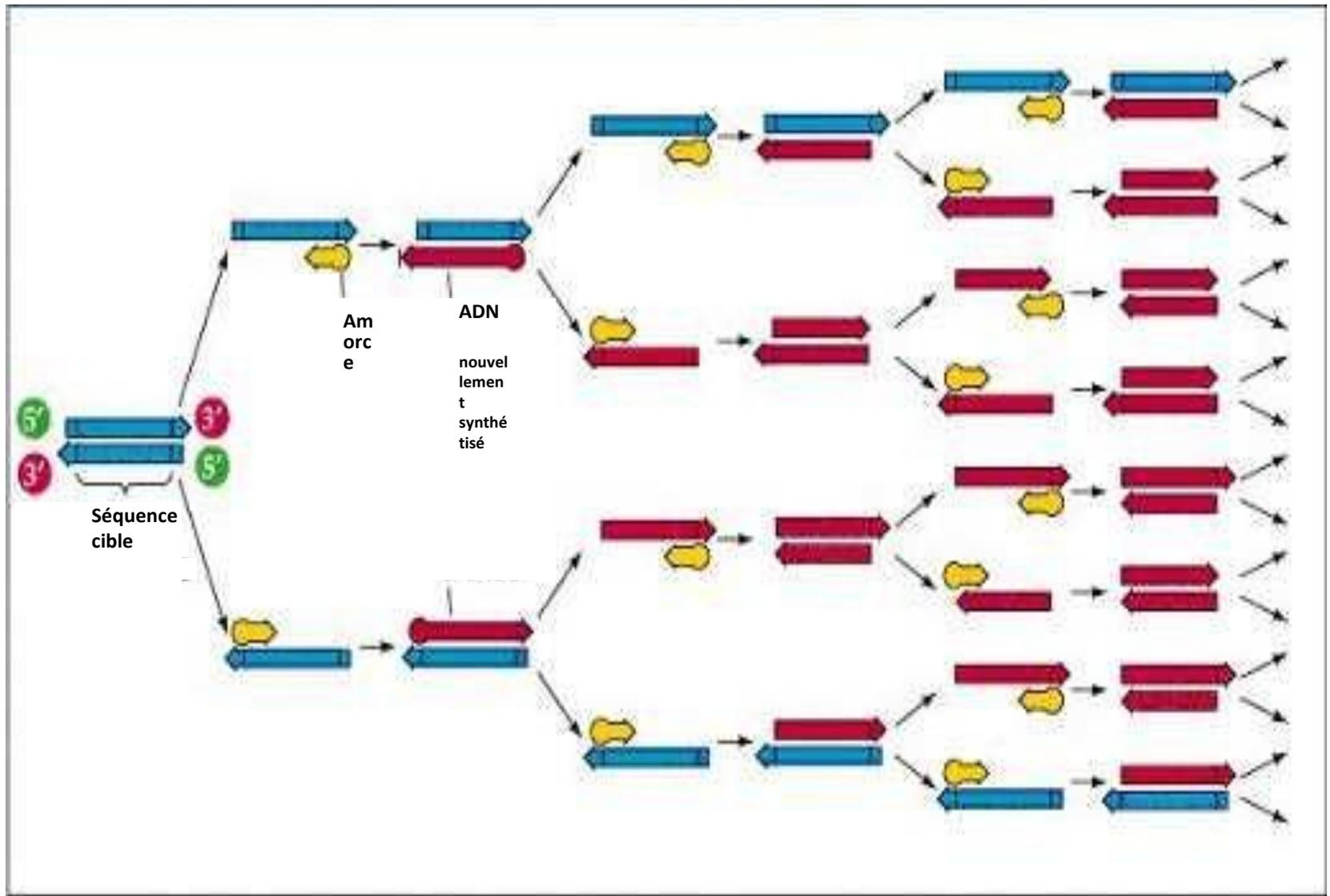
Cycle	1	2	3	4	5	6	-----n	<b>n</b> : nombre de cycle
Copies totale (N)	2	4	8	16	32	64	-----	$N=2^n$



**Fig.7:** Réaction d'amplification d'ADN dans le thermocycleur et visualisation du produit de PCR par électrophorèse



**Fig.8:** Profile de cycles de la température de la PCR



**Fig.9:**Amplification d'ADN par PCR. Le produit d'un cycle sert de matrice pour le cycle qui suit