**CHAPITRE 1 Les enzymes « outils » de la biologie moléculaire**

Ils permettent de travailler sur les acides nucléiques, de les modifier, de les couper, de les associer

***1- les nucléases (DNases et RNases)***

 **a) Les DNases**

Leur fonction consiste à couper l’ADN au niveau d’un phosphate, libérant deux fragments un se terminant par un 3’OH et l’autre par un 5’ phosphate.

On distingue les exonucléases qui digèrent l'ADN en retirant les nucléotides à partir d’une extrémité, des endonucléases qui coupent un des deux brins au milieu du polymère.

 **α- Les exonucléases**

*exonucléase III* est une 3'5’ exonucléase, elle retire les nucléotides d'une manière séquentielle à partir

de l'extrémité 3' (à la condition qu'elle ne soit pas sortante).

*Exonucléase I* est une 3’5’ exonucléase qui clive uniquement le simple brin (à condition que l’extrémité 3’ soit une extrémité OH.

*Bal 31* est aussi une exonucléase dont l’activité principale est une 3' exonucléase mais qui a aussi une

activité 5’3’ exonucléase. Elle a de plus une activité secondaire d’endonucléase sur le simple brin généré par l'exonucléase.

 **β- Les endonucléases**

Les endonucléases ont diverses spécificités de substrat, certaines coupent l'ADN double brin d'autre

l'ADN simple brin, enfin certaines reconnaissent et coupent au niveau de séquences caractéristiques.

 **DNase I** : endonucléase qui coupe l’ADN double ou simple brin. On l’utilise par exemple lorsque

l’on veut éliminer l’ADN d’une solution ou pour faire des « nicks » sur l’ADN comme dans la technique de marquage par déplacement de coupure (nick translation). Dans ce dernier cas on effectue une digestion ménagée. En présence de Mg2+, la Dnase I coupe chaque brin de manière indépendante. En présence d’ions Mn2+ (10 mM), elle produit préférentiellement des coupures double brin. On l’utilise alors pour générer des fragments au hasard.

 **Nucléase S1** : dégrade principalement l’ADN simple brin et l’ARN. On l’utilise par exemple lorsque l’on veut réduire la taille d’un fragment d’ADN en l’attaquant par ses extrémités. Dans ce cas on fait agir l’exonucléase III qui grignote l’extrémité 3’, on obtient une extrémité 5’ simple brin sortante puis on fait agir la nucléase S1 pour digérer cette extrémité.

 **Les DNase de restriction (**ou enzyme de restriction, restrictase) : endonucléases qui coupent au niveau d’une séquence particulière ou à proximité.

Il existe trois grandes classes (type I, II et III) seules les enzymes du type II sont utilisées en biologie moléculaire. Elles reconnaissent une séquence et coupent au niveau d’un site fixe appartenant à cette séquence ou à sa proximité. (les types I et III ne sont pas utilisés en biologie moléculaire, en effet ils portent aussi une activité de méthylation et l'activité de coupure est ATP dépendante. De plus les enzymes de type I ne coupent pas au niveau du site de reconnaissance, elles digèrent l’ADN au hasard).

*Les enzymes de restriction de type II :*

Les enzymes de restriction reconnaissent des séquences le plus souvent palindromiques et libèrent des extrémités 5’ phosphate et 3’ OH et donnent soit des extrémités cohésives soit des extrémités franches.

Par exemple :

- Eco RI reconnaît et coupe la séquence G/AATTC (5' sortante)

- Pst I reconnaît et coupe la séquence CTGCA/G (3' sortante)

- Sma I reconnaît et coupe la séquence CCC/GGG ce qui donne des extrémités franches

*Fragment de restriction* : fragment d’ADN généré après coupure d’une molécule d’ADN par des endonucléases de restriction.

*nomenclature* : Le nom des enzymes de restriction provient de la bactérie dont elles ont été isolées. Par exemple Eco RI provient d'*Escherichia coli* souche R, le I signifie que c'est la première enzyme qui a été découverte. Pour la bactérie, cette enzyme sert à digérer l’ADN des phages qui pourraient l'infecter. Les enzymes de restriction reconnaissent 4, 6 ou 8 bases

On appelle isoschizomères des enzymes qui reconnaissent et coupent la même séquence mais qui proviennent de deux bactéries différentes

*Types de coupures realisées par les enzymes de restriction.*

Les enzymes de restriction peuvent donner deux types de coupures: la coupure à bouts francs et la coupure à bouts collants.

La coupure à bouts francs aboutit à une coupure au milieu de la séquence palindromique. La coupure à bouts collants (ou à extrémités adhésives) correspond à une coupure qui se fait de part et d’autre du centre de symétrie.

Les sites de restriction sont repérés dans l’ADN par l’enzyme de restriction qui coupe l’ADN en principe autant que fois qu’il y a de sites de restriction. Ceci est valable pour une enzyme de restriction donnée, pour une autre enzyme, la coupure se fera en une position différente sur l’ADN. On voit tout de suite les possibilités considérables de ce type d’outils enzymatiques. L’ADN est découpé en fragments variables et ceci aussi bien l’ADN circulaire des bactéries ou des plasmides que l’ADN linéaire.

*Utilisation des enzymes de restriction.*

Il y a deux grands domaines d’utilisation des enzymes de restriction. Le premier est la cartographie

d’un fragment d’ADN. On peut en effet identifier un fragment d’ADN grâce à sa carte de restriction,

c’est à dire grâce à la position relative des sites de restriction. Le deuxième domaine d’utilisation est

la construction de molécule d’ADN recombinante. Un fragment de restriction peut être recollé (ligué)

à un autre fragment d’ADN si les deux extrémités sont compatibles, c’est à dire présentent les mêmes

extrémités cohésives ou des extrémités franches.

*Inhibitions de coupure par des méthylases:* les enzymes de restriction sont sensibles à leur propre méthylase (voir plus loin) mais elles peuvent aussi être sensibles si le site de coupure recouvre un site

Dam, Dcm, CpG, EcoK et EcoB. Par exemple l’enzyme Cla I reconnaît le site ATCGA/T mais elle est bloquée par la méthylase CpG qui est présente chez certains eucaryotes. Un autre exemple, la séquence de l’ADN à couper est GATCGA/T, il y a recouvrement avec la méthylation par Dam qui reconnaît le site GATC.

 **b) Les RNases**

Ces nucléases coupent l’ARN. Quelques RNases sont utilisées en biologie moléculaire :

- RNAse A : coupe après (en 3') les résidus pyrimidiques (C, U) en donnant un 3' phosphate sur l'ARN simple brin.

- RNase T1 : coupe en 3' de la guanosine donnant une guanosine 3' phosphate.

Ces deux enzymes sont utilisées pour dégrader l’ARN, pour séquencer directement l’ARN ou pour couper les fragments d’ARN non hybridés à de l’ADN. Elles peuvent également être utilisées comme sondes de structure (ne digèrent le nucléotide ou la région concernée que s’il est sous la forme simple brin).

- RNAse H : digère l'ARN dans un complexe ARN-ADN. On s’en sert pour éliminer l’ARN après avoir fabriqué un premier brin de cDNA à l’aide de la reverse transcriptase.

*Les inhibiteurs de RNAse :* Dans les expériences nécessitant l’utilisation d’ARN, il est difficile de purifier l’ARN sans trace de RNAse. Ces RNAse sont des enzymes extrêmement stables, le plus souvent elles se renaturent après chauffage à 100°C. Il n’est donc pas possible de les inactiver par autoclavage. Une possibilité est d’utiliser un inhibiteur de RNAse tel que la RNasin®. C’est une protéine de 50 kDa qui inhibe les RNAse en interagissant avec elles selon une stoechiométrie 1:1 et une constante de dissociation de 10-16 M.

***2-Les polymérases***

Toutes les polymérases synthétisent les acides nucléiques de 5' vers 3' en utilisant des nucléotides triphosphates. L’énergie est fournie par les nucléotides triphosphates entrants. Pourquoi la polymérisation ne se fait-elle pas dans l’autre sens ? Dans le sens 5’3’, en cas d'erreur il y a excision du dernier nucléotide incorporé libérant un 3' OH. La synthèse peut continuer avec l’ajout d’un nouveau nucléotide. Si la synthèse se faisait dans l'autre sens de 3’ vers 5’, l’énergie de la réaction serait fournie par l’extrémité 5’ triphosphate de la chaîne en cours de polymérisation. En cas d'erreur, il y aurait excision du dernier nucléotide et on obtiendrait une nouvelle extrémité 5' monophosphate. On aurait donc besoin d’énergie pour repartir dans la synthèse.

 *Les ADN polymérases thermostables*

La Taq ADN polymérase de *Thermus aquaticus*

Elle a les activités 5'-3' polymérase et 5'-3' exonucléase. Son avantage est d'être thermostable.

Comme elle est dépourvue d'activité 3'-5' exonucléase, le taux d'erreurs est d'environ 10-5 par base dupliquée et l’activité terminal transférase est efficace.

 Cette polymérase est plus efficace que la Taq ADN polymérase et les produits d’amplification sont plus faciles à insérer dans un vecteur de clonage.

***3- Les topoisomérases***

La topoisomérase I du virus de la vaccine coupe en 3' de la séquence (C ou T) CCTT en formant un

3’ phosphate-enzyme et un 5’ OH. Elle reforme ensuite la liaison phosphodiester. Si on ajoute deux séquences (C ou T)CCTT sur les deux brins et à proximité, on a coupure des deux brins, la topoisomérase reste attachée par une liaison covalente au brin d’ADN. En présence d’un fragment d’ADN, elle peut

reformer la liaison à condition que la séquence du fragment d’ADN soit 5’OH.

***4- Les ligases***

 *T4 ADN ligase*

Elle catalyse la formation d'un pont phosphodiester entre un 3' OH et un 5' phosphate, elle a besoin

d'ATP et d’ions divalents. Elle ligue de l’ADN double brin.

 *Utilisation* : ligation d'extrémités cohésives ou d'extrémités franches de fragments de restriction.

Dans le cas d’extrémités franches, la ligation est souvent effectuée à 15-20°C pendant 4 à 16 heures pour favoriser l’interaction entre les extrémités.

Si les deux extrémités sont déphosphorylées, la ligation ne peut avoir lieu, par contre si une seule est déphosphorylée, la ligation a lieu sur un des deux brins, l'autre reste avec un nick.

Généralement les extrémités cohésives sont générées en coupant par des enzymes de restriction. Le plus souvent, les extrémités à liguer seront générées par la même enzyme mais ce n’est pas obligatoire. Par exemple les enzymes Bam HI (G/GATCC), Bgl II (A/GATCT) et Mbo I (N/GATCN) donnent des extrémités cohésives qui peuvent être ligaturées car elles sont compatibles Toutefois après certaines ligations comme celles d’une extrémité Bam HI et d’une extrémité Bgl II on ne pourra pas redigérer le produit par l’une ou l’autre des deux enzymes.

 *La Taq ADN* *ligase* a la même activité que la T4 ADN ligase, mais elle nécessite du NAD à la place

de l’ATP. Elle est plus stable et fonctionne à 45°C. Elle s’utilise dans des méthodes de détection de mutation, lorsqu’on veut faire plusieurs ligations successives entrecoupées d’une étape de dénaturation

 *T4 ARN ligase* Catalyse la jonction entre un 5' phosphate d'un ARN ou d'un ADN simple brin avec un 3' OH (ions divalents et ATP)

 *ADN ligase d’E. coli* Ligue des extrémités cohésives double brin d’ADN. L’ADN ligase d’E. coli est inefficace pour liguer des extrémités franches ou pour liguer de l’ARN. Elle utilise du NAD comme cofacteur.

***5- Les méthylases***

Les enzymes de restriction sont produites par des bactéries pour se protéger des phages. Pour que l’ADN bactérien ne soit pas lui-même digéré, la bactérie produit aussi des méthylases spécifiques qui inhibent la digestion. Ainsi Eco RI ne coupe pas GAm6ATTC. On pourra utiliser ces méthylases pour inhiber la digestion d’un fragment.

Les enzymes de restriction reconnaissant la même séquence ne sont pas sensibles aux même méthylations On pourra donc détecter des zones sur l’ADN qui sont méthylés en digérant avec deux enzymes, une sensible et l’autre non. Les produits seront déposés sur un gel d’électrophorèse et la digestion sera analysée après un Southern. Si la bande est détectée uniquement avec l’enzyme insensible à la méthylation, on peut en déduire que la zone sondée est méthylée.

**CHAPITRE 2 Extraction et purification des acides nucléiques**

1. Extraction des acides nucléiques

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

Dans la pratique, les acides nucléiques sont souvent extraits du sang total. Le procédé classique est l’extraction par le couple phénol-chloroforme. Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et il permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques. Il est ensuite éliminé par l’extraction avec du chloroforme (non miscible avec l’eau). La séparation des phases aqueuse et organique peut se faire par centrifugation. La phase aqueuse contient les acides nucléiques. Des traitements par des agents clivant les protéines (protéolyse) peuvent être nécessaires. Les acides nucléiques peuvent être finalement récupérés sous forme solide à la suite de précipitation par l’alcool éthylique ou par l’alcool isopropylique. De nombreux réactifs sont disponibles, prêts à l’emploi, ce qui permet de simplifier les opérations de purification. Il est possible d’extraire les acides nucléiques à partir d’échantillons biologiques variés: cultures cellulaires, tissus divers etc... Les méthodes d’extraction doivent bien entendu être adaptées aux quantités disponibles de matériel biologique.

Extraction d’ADN à partir du sang

Faire éclater les globules rouges du sang par choc osmotique en le mélangeant à une solution hypotonique. Récupérer des globules blancs par centrifugation. Ajouter un mélange de détergent (SDS ou Sarcosyl) et de protéinase K ; le détergent détruira les membranes et la protéinase digérera les protéines associées à l'ADN. Extraire l'ADN des protéines par un mélange phénol-chloroforme. Ajouter des sels pour augmenter la force ionique puis précipitation de l'ADN par l'alcool éthylique absolu froid (-20°C).

L'ADN précipite sous forme de filaments, visibles à l’œil nu, qui sont récupérés par enroulement sur une baguette de verre. Re-dissoudre l'ADN dans une solution tamponnée. L'ADN peut être ainsi conservée à 4°C plus d'un an.

Remarque : Le rendement de cette méthode est de quelques centaines de microgrammes d'ADN pour 10 à 20 ml de sang.

1. Purification des acides nucléiques

La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l’analyse PCR. La pureté de l'ADN extrait est appréciée en mesurant la densité optique des extraits à 260 et 280 nm qui correspondent, respectivement, aux longueurs d’onde d’absorption des acides nucléiques et des protéines, en effectuant le rapport de DO à 260 nm sur la DO à 280 nm. Ce rapport constitue un bon indicateur de la pureté de l’ADN.

• Si le rapport DO260/DO280 est compris entre 1.6 et 2 => l’ADN est suffisamment pur.

• Si le rapport DO260/DO280 > 2 => l’ADN est contaminé par les ARN.

 • Si le rapport DO260/DO280 < 1,6 => l’ADN est contaminé par les protéines.

Dans le cas où l’ADN est contaminé, un bon résultat est à écarter dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par la réextraction de la pelote de l’ADN afin d’obtenir la pureté souhaitée. Les échantillons d’ADN purs sont conservés à + 4°C jusqu’à utilisation.

 **CHAPITRE 3 Amplification des acides nucléiques particuliers**

1. PCR ( Amplification Chain Reaction)

Cette technique décrite en 1985 (K. MULLIS et collaborateurs) permet d’amplifier des séquences d’ADN de manière spécifique et d’augmenter de manière considérable la quantité d’ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l’ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides en général). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d’ADN à amplifier. L’ADN polymérase les utilisera comme amorces.

*Réalisation pratique.*

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

- Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d’ADN (92-95°C)(30 secondes-1 minute).

- Une phase d’hybridation avec les deux amorces spécifiques entre 55-60°C. La première amorce se fixe sur un brin d’ADN, l’autre sur le brin complémentaire (30 secondes-1 minute).

- Une phase d’extension par l’ADN polymérase à partir des amorces à 70-72°C (1-2 minutes).

Cette technique a pris un essor considérable avec l’introduction d’une ADN polymérase résistante à la chaleur. Cette ADN polymérase ou Taq polymérase est extraite d’une bactérie thermophile (Thermus aquaticus). Elle permet une automatisation des différents cycles (dans des appareils appelés thermocycleurs). Le nombre de cycles est généralement compris entre 30 et 40. Cette méthode permet d’amplifier l’ADN compris entre les deux amorces d’un facteur de 105 à 106. Les résultats doivent être optimisés en fonction d’un certain nombre de paramètres: concentration en MgCl2, concentration en amorces, spécificité des amorces etc... Le choix des amorces est particulièrement crucial pour obtenir des résultats satisfaisants (spécificité, taille, paramètres physico-chimiques.....). L’introduction de logiciels spécialisés et des bases de données nucléotidiques a permis de réaliser des choix plus rationnels.

La Taq polymérase extraite de Thermus aquaticus présente une activité exonucléasique 5’à3’, mais elle est dénuée d’activité exonucléasique 3’à5’, c’est-à-dire de la fonction d’édition. Elle peut insérer des bases qui ne suivent pas la règle classique d’appariement et ceci au hasard. On estime qu’elle réalise une mauvaise incorporation toutes les 104 à 105 bases.

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

- La PCR dite « Multiplex » pour amplifier des gènes avec de nombreux exons (le gène CFTR impliqué dans la mucoviscidose possède 27 exons), il est possible d’introduire dans le milieu d’amplification des couples d’amorces spécifiques différentes.

- La PCR dite « Nested PCR ». Elle correspond à une seconde PCR réalisée en utilisant des nouvelles amorces situées à l’intérieur du domaine défini par les amorces de la première PCR.

- La PCR quantitative. Dans ce type de PCR, on cherche à estimer le nombre de copies présent dans la séquence cible d’ADN ou d’ARN. La proportionnalité entre le nombre d’amplifications et le nombre de copies n’est valable que pour un nombre de cycles PCR faible.

**II. Utilisation de PCR**

Les utilisations des produits PCR sont très variées, nous citerons quelques exemples:

-Mise en évidence de mutations ponctuelles par hybridation des produits PCR avec des sondes oligo-nucléotidiques (technique dite du « dot-blot »).

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

-Analyse de restriction.

Le produit PCR est soumis à une digestion enzymatique par une enzyme de restriction. Si une mutation ponctuelle modifie le site de restriction initialement présent, la taille des fragments d’ADN obtenus après digestion sera modifiée et décelable après électrophorèse des fragments d’ADN (sur gel d’agarose ou gel de polyacrylamide).

-Introduction du produit PCR dans un vecteur: clonage du produit PCR .

-Séquençage direct du produit PCR (voir cours sur le séquençage).

**CHAPITRE 4 Séparation des acides nucléiques**

*Electrophorèse*

Technique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique. On peut ainsi analyser et purifier dans un milieu gélifié (gel d'agarose, gel de polyacrylamide...) l'ADN, l'ARN, les protéines.

*Migration électrophorétique des fragments d’adn.*

Les fragments d’ADN après digestion par les enzymes de restriction peuvent être séparés par électrophorèse sur un gel d’agarose. Dans ce type de gel, les migrations des fragments d’ADN dépendent de la taille du fragment plus que de la charge de celui-ci. Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d’inclusion sera importante. A l’opposé les fragments de petite taille auront une distance de migration la plus élevée. La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse est effectuée en faisant migrer des marqueurs de poids moléculaire en parallèle avec les échantillons à analyser. La détection de l’ADN sur ce type de gel est réalisée par exposition aux rayons UV après réaction avec un réactif spécifique (bromure d’éthidium par exemple, agent s’intercalant entre les brins d’ADN).

L’électrophorèse des fragments d’ADN en gel d’agarose permet des séparations jusqu’à 20-25 kb (20000-25000 pb). Le tampon utilisé pour la migration électrophorétique a un pH basique (par exemple: 8,3 dans le cas du tampon appelé TBE = Tris-Borate-EDTA).

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

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

**CHAPITRE 5 Les vecteurs et clonage moléculaire**

Rôle d'un vecteur : capable de transporter l'ADN d'intérêt (d'où le nom de vecteur), c'est un morceau d'ADN capable d'auto-réplication. Il doit être petit de façon à être manipulé *in vitro* Pour satisfaire à ces deux exigences, on utilise soit des plasmides soit des virus, soit des petits chromosomes.

 **1- Les plasmides**

Les plasmides sont de petits morceaux d'ADN circulaires, double brin que l'on trouve dans les

bactéries en dehors du chromosome (épisomes). Ils se répliquent grâce aux enzymes présents dans la

bactérie.

On est capable de les introduire dans une bactérie par des méthodes chimiques (CaCl2) ou des

méthodes physiques (électroporation). C'est la transformation bactérienne (notion différente de la

transformation des cellules eucaryotes).

 **Les parties essentielles :**

* Une origine de réplication, importante pour l'initiation de la réplication.
* Un site de restriction pour pouvoir insérer un fragment d'ADN (ce fragment d'ADN est souvent appelé insert).
* Un gène de résistance aux antibiotiques : permet de sélectionner les bactéries ayant incorporés le plasmide de celles qui ne l'ont pas incorporé.

 **Les parties accessoires :**

* Un polylinker ou site de clonage multiple.

L'insertion d'un insert dans un plasmide lorsqu'il n’y a qu'un seul site de restriction n'est pas facile. Pour faciliter les clonages, on a inséré dans le vecteur une séquence présentant une série de sites de restriction uniques dans le vecteur.

* Un gène codant pour le peptide α de la β-galactosidase.

Après la transformation, on a des bactéries qui ont un vecteur seul et des bactéries qui ont le plasmide recombinant. Pour trier ces bactéries, on a inséré le site de clonage à l'intérieur d'un gène codant pour le peptide α de la β- galactosidase. Le clonage de l'insert crée une mutation par insertion, inactivant le peptide. Si le plasmide est introduit dans une souche déficiente pour le peptide α, le vecteur seul permet la synthèse de galactosidase par contre le vecteur plus l'insert ne le permet pas.

 ***2 -Les phages***

**Le phage λ**

C'est un virus à ADN double brin, linéaire de 50 kb avec à ses deux extrémités 12 nucléotides simple brin

complémentaires (extrémité cohésives ou cos).

 *Le phage λ en tant que vecteur :*

Dans le phage λ, la longueur de 50 kb de son ADN est importante pour l'empaquetage.

Pour l'utiliser en tant que vecteur on retire 20 kb et on insère à la place le fragment d'ADN d'intérêt.

 *Intérêt du phage λ:*

* On dispose d'un moyen très efficace pour faire rentrer l'ADN dans la bactérie.
* Le criblage des banques avec un anticorps ou avec une sonde nucléotidique est plus aisé que lorsqu’on utilise un plasmide.

 ***3-Chromosomes***

Plusieurs chromosomes peuvent être utilisés comme vecteur

 - les YAC (yeast artificial chormomosome) sont dérivés des chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae*. Ils contiennent une origine de réplication, un centromère et deux télomères. Ces vecteurs ont été principalement utilisés pour réaliser des clonages positionnels mais cette application est aujourd’hui abandonnée car elle est difficile à réaliser et qu’il y avait trop de recombinaisons.

 - Les BAC (Bacterial artificial chromosome) sont des dérivés du facteur F. Leur taille est d’environ 100 kb, et ils se maintiennent chez *E. coli* comme simple copie.

 - Les PAC (P1 artificial chromosome) sont des dérivés du phage P1.

 ***4-Plasmide + M13 = phagemide :***

Le phagemide est un plasmide qui contient l'origine de réplication de M13. une séquence suffisante pour le packaging de l'ADN simple brin dans les particules du phage. Le M13 produit toutes les protéines pour la réplication en simple brin et l'encapsidation si bien que les deux ADN, du M13 et du plasmide sont encapsidés..

 ***5- Plasmide + phage λ = cosmide :*** On ajoute deux extrémités cos à un plasmide. Si on clone dans ce plasmide un grand fragment d'ADN (d'environ 45 kb) de telle façon que plasmide et insert font 50 kb, cet ADN pourra être encapsidé *in vitro* dans le phage λ. Il pourra donc être introduit avec une grande efficacité dans la bactérie. Par contre une fois à l'intérieur, il se répliquera comme un plasmide. Les extrémités cos permettent donc de sélectionner les recombinant avec de grands inserts (45 kb) et à introduire le plasmide dans la bactérie.

 ***6-Plasmide + phage λ + phage M13 = λ Zap :*** (Short et coll., 1988) On a ici un hybride entre trois vecteurs. Un plasmide est inséré dans le phage, il est inséré au niveau de l’origine de réplication de M13

1. Clonage

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

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

*ADN recombinant*

*Il s’agit d’un ADN hybride obtenu au laboratoire par la combinaison de deux ADN appartenant à deux espèces différentes.*

II.1 Les étapes de clonage

*Préparation des plasmides pour la recombinaison, constitution de l’hybride et transformation bactérienne.*

L’insertion d’une séquence d’ADN bicaténaire dans un plasmide nécessite un traitement préalable par une enzyme de restriction. On choisit une enzyme qui a un site unique dans la séquence plasmidique. Après action de l’enzyme de restriction, le plasmide circulaire est linéarisé. Pour maintenir la linéarisation, il est indispensable de traiter le plasmide linéaire par une phosphatase alcaline qui enlève les groupements phosphates en 5’. Le plasmide linéarisé et traité par une phosphatase alcaline est ajouté au fragment d’ADN à insérer en présence d’une ligase. L’ensemble de ces étapes produit un plasmide recombinant.

Les bactéries peuvent être placées dans certaines conditions physico-chimiques pour permettre aux plasmides d’être incorporés à l’intérieur de celles-ci. Les bactéries traitées et prêtes à recevoir l’ADN étranger sont appelées bactéries compétentes. *L’incorporation des plasmides dans les bactéries est appelée transformation bactérienne.*

*Sélection des bactéries transformées par des plasmides*

Le taux de transformation des bactéries est généralement très faible. Il est fondamental de disposer de méthodes permettant d’obtenir des bactéries transformées par les plasmides et seulement celles-ci. Pour cela, l’artifice consiste à utiliser une résistance à un antibiotique (par exemple: l’ampicilline). La transformation d’une bactérie sensible à un antibiotique par des plasmides portant un gène de résistance au même antibiotique aboutit à l’apparition d’une résistance uniquement pour les bactéries ayant incorporé les plasmides.

Cette technique permet de séparer les bactéries comportant des plasmides et les bactéries sans plasmides car ces dernières sont tuées. Cependant, elle ne permet pas de distinguer les bactéries avec plasmides intacts des bactéries avec plasmides recombinants. On utilise pour cela une résistance à un second antibiotique, par exemple: une tétracycline. L’insertion du fragment d’ADN dans le plasmide doit inactiver le gène de résistance au deuxième antibiotique. Les bactéries transformées par les plasmides recombinants sont donc résistantes au premier antibiotique (ampicilline) et sensibles au deuxième antibiotique (tétracycline). Les bactéries non transformées sont sensibles aux deux antibiotiques.

**CHAPITRE 6 Le marquage des acides nucléiques**

Certains types d’expériences (Southern, northern, hybridation in situ, ...) nécessitent de visualiser une hybridation. Pour cela, il est nécessaire de marquer un acide nucléique (ADN ou ARN simple brin) qui prendra le nom de sonde.

***I) Les différents types de sonde et leur révélation***

***Sondes chaudes***

Comment marquer une sonde ? On dispose de plusieurs isotopes radioactifs qu’on pourra

incorporer dans la sonde. On peut utiliser :

Isotope demi-vie énergie

32P β- 14,3 jours 1.7 MeV

35S,β- 87.2 jours 0.17 MeV

14C, β- 5700 ans 0.16 MeV

3H, β- 12.3 ans 0.02 MeV

La détection des radioisotopes peut se faire de plusieurs manières : i) en utilisant un compteur à

scintillation, ii) par radioautographie (film sensible ou émulsion) iii) par un scanner spécial, le

phosphoimager.

***Sondes froides***

On peut utiliser des marquages non radioactifs. Dans ce dernier cas, on parle de sonde froide.

Les deux types de marquage froid les plus souvent utilisés sont les marquages à la biotine et à la

digoxigénine. Ces deux composés sont fixés sur un nucléotide, lui-même incorporé à la sonde.

La biotine est la vitamine H. C'est un cofacteur de réactions enzymatiques impliquées dans

l'incorporation ou le transfert de CO2 (si on mange trop de blanc d'oeuf, on inhibe l’incorporation de

CO2 dans le foie).

***Les différentes techniques de marquage des acides nucléiques***

Les méthodes enzymatiques sont les plus employées, on incorpore le nucléotide modifié à l’aide

d’une enzyme.

***Marquage interne***

Marquage de l’ADN. Deux méthodes peuvent être utilisées, la « nick translation » et le « ramdom

priming ».

1. La nick translation ou déplacement de coupure vise à marquer un ADN double brin. On digère

le fragment d’ADN par la DNase I de *E. coli* qui coupe après les pyrimidines, mais d’une

façon ménagée de façon à ne faire que quelques coupures au hasard sur le fragment. Ces coupures sur un seul des brins sont appelées des nicks, elles libèrent des extrémités 5’ OH à l’intérieur du fragment. On utilise ensuite l’ADN polymérase I de *E. coli* qui présente plusieurs activités dont une activité 5'-3'

exonucléase et une activité 5'-3' polymérase. (Il y a en plus une activité 3'-5' exonuclease moins

rapide que l'activité polymérase en présence de nucléotides). Les deux brins sont ainsi marqués surtoute leur longueur à l’exception de leur extrémité 5’.

2.le « Ramdom priming » Ramdom priming ou amorçage au hasard. On commence par dénaturer le fragment d’ADN. Puis on hybride des oligonucléotides au hasard. Pour ce-faire on utilise des petits oligonucléotides (6 à 8 mer) qui sont obtenus par coupure d’un ADN au hasard suivi d’une purification des fragments de 6 à 8 paires de base. Une fois ces oligonucléotides hybridés, on va synthétiser la séquence en aval, en 3’, à l’aide d’une polymérase n’ayant pas d’activité 5’3’ exonucléase. Dans les deux cas, les deux brins sont marqués et la sonde est double brin. Il faudra donc la dénaturer avant de s’en servir dans une hybridation Pour obtenir une sonde spécifique d’un seul brin on utilisera plutôt une sonde ARN synthétisée *in vitro.*

***Marquage aux extrémités***

Dans certains cas on a besoin que la sonde soit marquée uniquement à une extrémité. On peut

marquer soit l’extrémité 5’, soit l’extrémité 3’. C'est pour ainsi dire la seule méthode de marquage

utilisable pour les oligonucléotides, ils sont en effet trop petit pour envisager un marquage interne.

*Marquage en 5' des ARN par polymérisation*

La première base des ARN est généralement une adénine. Si on effectue une transcription *in vitro*

en présence de γATP 32P (ou βATP 32P), le seul A marqué sera celui qui est en 5’. Les autres adénines

incorporées dans l’ARN néosynthétisé ne seront pas marquées, en effet seul le phosphate en α restera dans le polymère.

*Marquage en 5’ des acides nucléiques* (ADN ou ARN)

A partir d’une extrémité 5’OH on peut ajouter un phosphate marqué à l’aide de la T4 Polynucléotide kinase et de γ 32P ATP. Il faudra au préalable obtenir l’acide nucléique avec un 5’OH. Pour les oligonucléotides synthétisés chimiquement, la synthèse s’effectue de 3’ vers 5’ et l’extrémité 5’ est OH. On n’a donc aucun traitement préliminaire à faire. Pour les ADN obtenus par digestion par une endonucléase de restriction, on a un 5’ phosphate. Ce phosphate peut être éliminé à l'aide d'une phosphatase. On obtient une extrémité 5'OH on détruit ensuite la phosphatase (chauffage, extraction phénolique par exemple), avant de faire agir la T4 PNkinase sur le produit de la réaction.

Pour les ARN messagers eucaryotes qui ont un cap en 5’, il faut détruire ce cap, par action d’une pyrophosphatase puis laisser agir la phosphatase sur le phosphate restant (voir plus loin pour la

structure du cap). Cette méthode est généralement employée pour les oligonucléotides pour lesquels les

marquages internes ne sont pas possibles du fait de leur petite taille.

*Marquage en 3'*:

Dans ce cas il va falloir ajouter un ou plusieurs nucléotides à l’extrémité 3’ de la sonde.

• Pour les ARN on utilisera une ARN ligase en présence d’un nucléotide monophosphate et d’ATP pour fournir de l’énergie. Le nucléotide sera ajouté en 3’ OH. Pour qu’il n’y ait pas qu’un seul nucléotide ajouté, on utilisera un nucléotide ayant son extrémité 3’ bloquée par exemple par un phosphate.

• Pour les ADN, on peut utiliser une deoxynucléotidyl terminal transférase avec un α 32P nucléotides. Il y a alors ajout de plusieurs nucléotides en 3'. Si on veut n'en rajouter qu'un, il faut utiliser un didéoxynucléotide marqué à la place d’un déoxynucléotide, la polymérisation sera ainsi bloquée après l’ajout du premier nucléotide.

• Pour les ADN, on peut aussi utiliser les DNA polymérases.

 **CHAPITRE 7 Hybridation Moléculaire**

*I)* ***Dissociation ou dénaturation***

Lorsque l'ADN double brin est chauffé à une température dite de fusion, ou Tm (pour

« melting temperature »), les deux brins se séparent suite à la rupture des liaisons hydrogènes qui les

maintiennent appariés. La double hélice perte de la structure secondaire, on dit que

l'ADN est dénaturé.

Le Tm dépend de deux facteurs principaux : du nombre de liaisons hydrogènes et de la composition du milieu.

Le nombre de liaisons hydrogène lui-même dépend :

- de la longueur du fragment : le Tm augmente avec la longueur. Toutefois, le nombre de liaisons

hydrogènes est important en dessous de 150-200 liaisons. Au-delà, la dénaturation devient

principalement un phénomène coopératif, et le nombre de bases n’est plus important. On tiendra donc

compte de la longueur des fragments principalement pour l’hybridation des oligonucléotides.

- de la composition en bases : l'augmentation de la proportion en GC augmente le Tm. Il y a en effet 3

liaisons hydrogènes entre les bases G et C et 2 entre les bases A et T. Donc plus la proportion en GC

est importante, plus la température de fusion sera élevée.

- de la présence de mésappariements : Les mésappariements abaissent le Tm, puisque au niveau du

mésappariement, il n’y a pas de liaison hydrogène.

Plusieurs éléments du milieu contribuent à l’établissement des liaisons hydrogènes et seront

utilisés pour faire varier le Tm.

- la force ionique. L’augmentation de la concentration en cations monovalents tel que le NaCl joue sur

le Tm. Le NaCl masque les charges négatives des phosphates et ainsi diminue les forces de répulsion

électrostatique entre les deux brins. Ainsi moins il y a de sel, plus les forces de répulsion sont

importantes, plus le Tm est bas.

- Certains composés tels que la formamide ou l'urée abaissent le Tm. Ces composés forment des

liaisons hydrogènes avec les bases et donc entrent en compétition avec les liaisons interbases.

- le pH est aussi important. Aux pH extrêmes, l’ADN est dénaturé. A température ambiante, on utilise

souvent le NaOH pour dénaturer l'ADN.

***Calcul du Tm***

• Pour les fragments de plus d’un kilobase (kb) on utilise souvent l’équation suivante pour

estimer le Tm :

Tm = 81,5 + 16,6 log M + 41 (G+C)

Où M est la concentration en cation monovalent et (G+C) représente la proportion de bases G et

C et (Schildkraut et Lifton , 1965).

• Pour des fragments plus petits, pour les olignucléotides, on utilise l’expression :

Tm = 81,5 + 16,6 log M + 41 (G+C) -500/L

L représente la longeur de l’oligonucléotide

• Si on utilise un agent dénaturant, abaissant le Tm tel que la formamide. On utilise l’équation

suivante

Tm = 81,5 + 16,6 log M + 41 (G+C) -500/L - 0,62 F

F représente la concentration molaire en formamide.

• Ces méthodes ne donnent que des approximations du Tm et la plupart des logiciels et serveurs

utilisent le model du « plus proche voisin » et des données thermodynamiques pour estimer le

Tm. L’équation la plus utilisées est (SantaLucia et coll., 1996, Panjkovich et Melo, 2004)

16.6log[ ]

***Hybridation***

L’hybridation correspond à l'association de deux brins d'acide nucléiques complémentaires.

Cette hybridation peut se faire entre deux brins d’ADN, deux brins d’ARN ou un brin d’ARN et un

brin d’ADN.

La dénaturation est réversible. Quand la température est abaissée progressivement jusqu’au

point de fusion (Tm), les molécules peuvent s'hybrider selon la règle de complémentarité des bases.

La réassociation, comme la dénaturation, dépend du Tm : pour qu’il y ait hybridation, il faut que la

température soit inférieure au Tm, mais l’hybridation dépend également de la concentration en ADN

et du temps. Ces deux derniers paramètres sont importants pour la rencontre entre les deux brins.

Ainsi, si on veut garder l'ADN sous forme dénaturée, on laisse l'ADN soit à une température

élevée, soit on le refroidit brusquement, on évite ainsi les mouvements moléculaires et donc la

probabilité de rencontre entre deux brins complémentaires.

***1) Hybridation en phase liquide***

Dans ce cas les deux brins sont en solution. On utilise l’hybridation en phase liquide dans plusieurs cas, par exemple :

**a)** Pour mesurer le Tm, en utilisant le fait que les acides nucléiques simples brins absorbent plus que les doubles brins.

**b)** Pour délimiter les introns et les exons d’un gène.

On utilise ici un fragment d’ADN génomique qui est cloné (inséré dans un plasmide). On peut donc en avoir une grande quantité.

- L’ADN est marqué de manière spécifique en général à une extrémité. Il est ensuite dénaturé puis hybridé avec une population d’ARN messager provenant d’une population de cellules (tissus, individu ou culture cellulaire)

- Seules les parties complémentaires s’hybrident, lesautres restent simple brin.

- L’ADN simple brin est digéré par la nucléase S1 qui ne digère que le simple brin (ARN ou ADN).

-Les fragments d’ADN sont visualisés sur gel après autoradiographie.

**c)** Comparaison des tailles de génome sans séquence répétitive.

**d)** Hybridation d'une amorce (les DNA polymérases ont besoin d'une amorce. *In vivo,* cette amorce

est fournie par la primase qui est une RNA polymérase. *In vitro*, l'amorce est le plus souvent un

oligonucléotide qui est synthétisé chimiquement).

- Hybridation d'extrémités cohésives.

Les DNases de restriction génèrent souvent des fragments complémentaires. Ces fragments peuvent

s'hybrider ce qui va faciliter une ligation.

Le phage λ présente à ses extrémités des bouts complémentaires (extrémités cohésives ou cos

qui peuvent s'hybrider sur 12 bases)

***2) Hybridation sur support solide***

L'immobilisation de l'une des séquences complémentaires facilite certaines manipulations

quoiqu’elle soit souvent moins sensible du fait que le support masque souvent une partie des bases.

**a) Fixation sur gel de chromatographie :**

**b) Fixation sur membrane**:

Il y a plusieurs sortes de membranes : la nitrocellulose, le Nylon ou la lamelle de verre.

Le Southern, le northern et la puce à ADN sont quelques exemples d’utilisation de ce type de

support.

\* Southern

L'ADN est coupé par des enzymes de restriction qui coupent à des séquences précises (la digestion

doit être totale)

- Le milieu de digestion est déposé sur un gel électrophorèse. Les fragments d'ADN se séparent, ils

migrent plus ou moins vite en fonction de leur taille, les plus petits migrent le plus vite.

- Les fragments séparés sur le gel sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose ou de

Nylon puis dénaturés (alternativement la dénaturation peut se faire avant le transfert).

- Les différents fragments d’ADN sont ensuite fixés sur la membrane et la membrane est saturée avec

de l'ADN simple brin.

- La membrane est ensuite plongée dans une solution contenant un fragment d'ADN marqué

radioactivement simple brin (sonde). La membrane ayant été saturé à l’étape précédente, la sonde ne

s’accrochera pas à la membrane.

- Le bain est maintenu à une température inférieure au Tm. L'hybridation a lieu lorsqu'il y a une

séquence complémentaire à la sonde sur la membrane.

- La membrane est lavée à une température proche du Tm de façon à retirer les hybridations non

spécifiques.

- On effectue enfin une autoradiographie pour voir où la sonde s'est accrochée

Informations obtenues par le Southern :

- Nombre de gènes, dans ce cas il faut que la sonde provienne d’un ADN génomique.

- Cartographie

- Détection de mutations

**Hybridation sur puce à ADN.**

Une puce à ADN est une lamelle de verre sur laquelle on a fixé des brins d’ADN qui sont

souvent des oligonucléotides. Les brins sont arrangés de telle manière à connaître la séquence

correspondant à chaque spot. La sonde est marquée à l’aide d’un composé fluorescent et la détection s’effectue à l’aide d’un laser. La présence d’une hybridation indique qu’il existe une séquence complémentaire dans la sonde.

**\* Hybridation in situ**

On peut considérer deux sortes d’hybridation in situ, l’hybridation sur chromosome et

l’hybridation des ARN. Dans le premier cas on localise le locus où s’hybride la sonde, dans le

deuxième cas on localise le patron d’expression d’un ARN dans un tissu, un organe ou même un

organisme …

**Hybridation sur chromosome**

L’hybridation est effectuée sur une préparation de chromosomes.