@Mohamed_Nahli

BIOLOGIE MAROC
www.biologie-maroc.com

Biochimie Structurale

SCIENCES DE LA VIE

Shop

• Cahiers de Biologie + Lexique
• Accessoires de Biologie

Etudier

Visiter Biologie Maroc pour étudier et passer des QUIZ et QCM enligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.

Emploi

• CV • Lettres de motivation • Demandes...
• Offres d'emploi
• Offres de stage & PFE

Méthodes d'étude des acides nucléiques

Pr. Boutaïna BELQAT

4 – Méthodes d'étude des acides nucléiques

- **4.1 – Hybridation des acides nucléiques**
- **4.2 – Amplification enzymatique de l'ADN par PCR (Réaction de Polymérisation en chaîne)**
- **4.3 - Séquençage d'ADN**

4.1 – L'hybridation des acides nucléiques

Elle représente un ensemble de techniques apparentées basées sur cette observation :

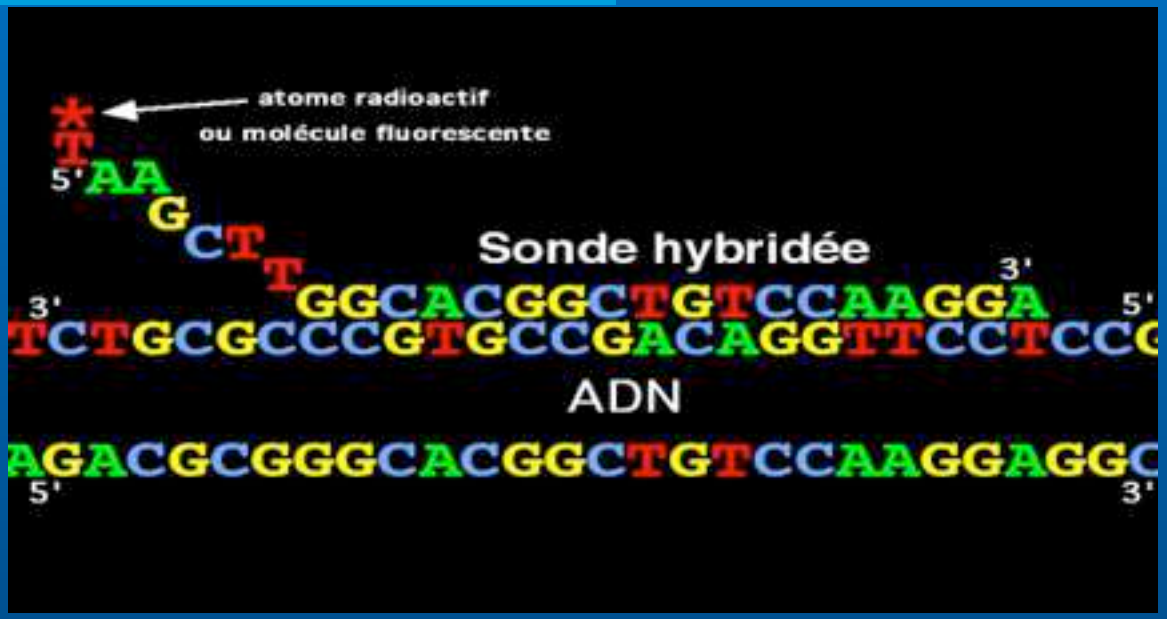
2 molécules d'acides nucléiques monocaténaires ayant des séquences de bases complémentaires peuvent former un hybride bicaténaire.

4.1.1- Les sondes hybridées

4.1.2- Formation des hybrides

Sonde nucléotidique

= Segment de nucléotide qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'ADN que l'on désire étudier.



- Pour reconnaître spécifiquement une séquence d'ADN, on utilise au laboratoire un petit morceau d'ADN synthétisé (sonde) dont la séquence correspond au moins en partie à celle d'un des brins de l'ADN.

4.1 – Hybridation des acides nucléiques

- **Ainsi, la sonde est capable de se fixer spécifiquement sur l'autre brin à l'endroit où se lit la séquence complémentaire.**
- **En marquant cette sonde par un atome radioactif* ou par une molécule fluorescente liés covalentiellement à un des nucléotides de la sonde, on peut détecter la sonde et le morceau d'ADN complémentaire qui lui est hybridé.**

Exp°: Sonde hybridée

Utilisation d'une séquence de l'ADN comme base.

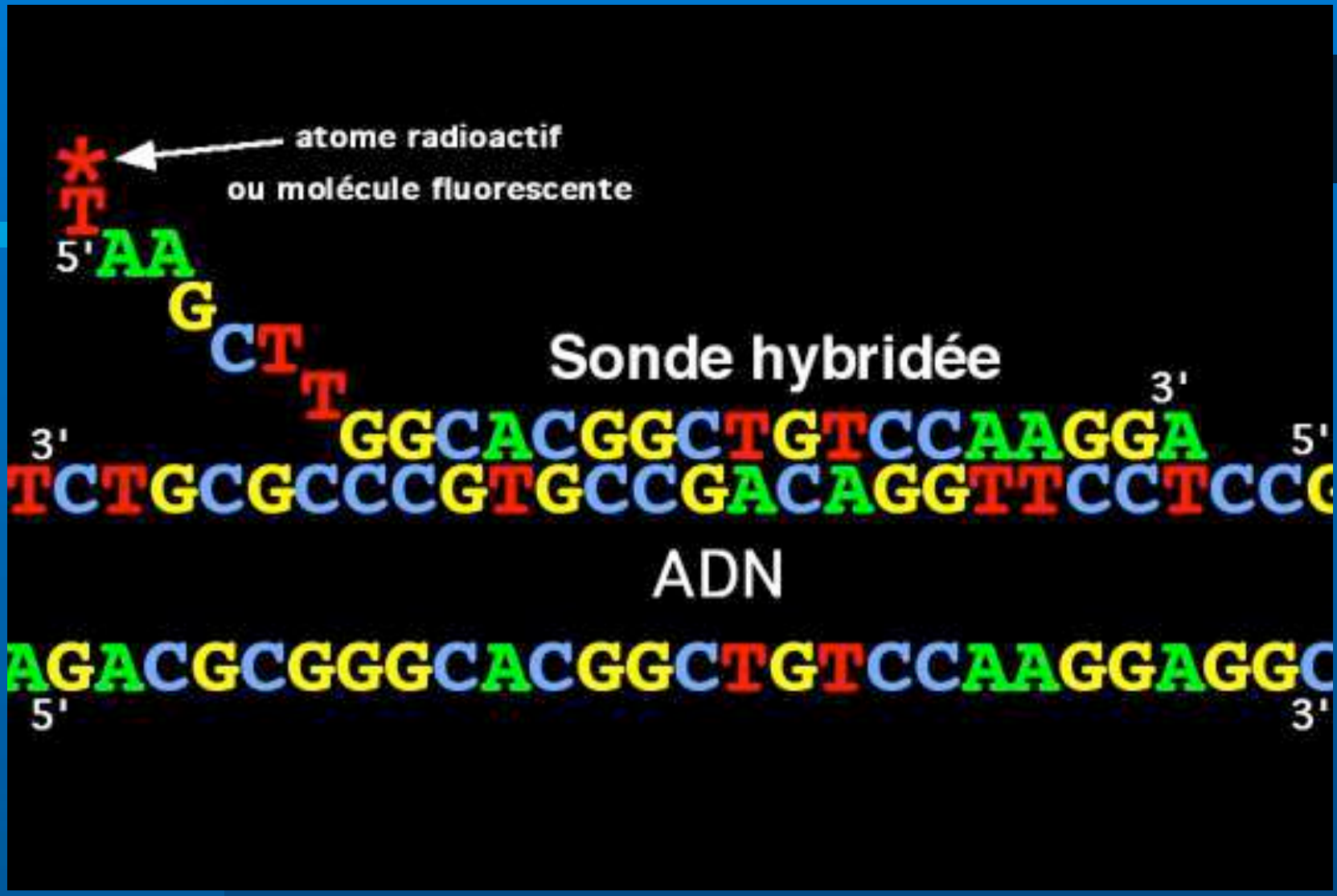


Fig. 33. Expérience de la sonde hybridée utilisant comme base une séquence de l'ADN

4.1.2 – Formation des hybrides :

- Elle nécessite des molécules en simple brin et requiert donc une dénaturation préalable de la molécule de DNA:
  - **soit par la chaleur (95°C)**
  - **soit par un traitement alcalin.**
- Incubation des 2 populations d'ADN monocaténaires complémentaires dans des conditions qui favorisent la formation de molécules bicaténaires.

Molécules en simple brin

Incubation de monobrins complémentaires en vue d 'hybridations

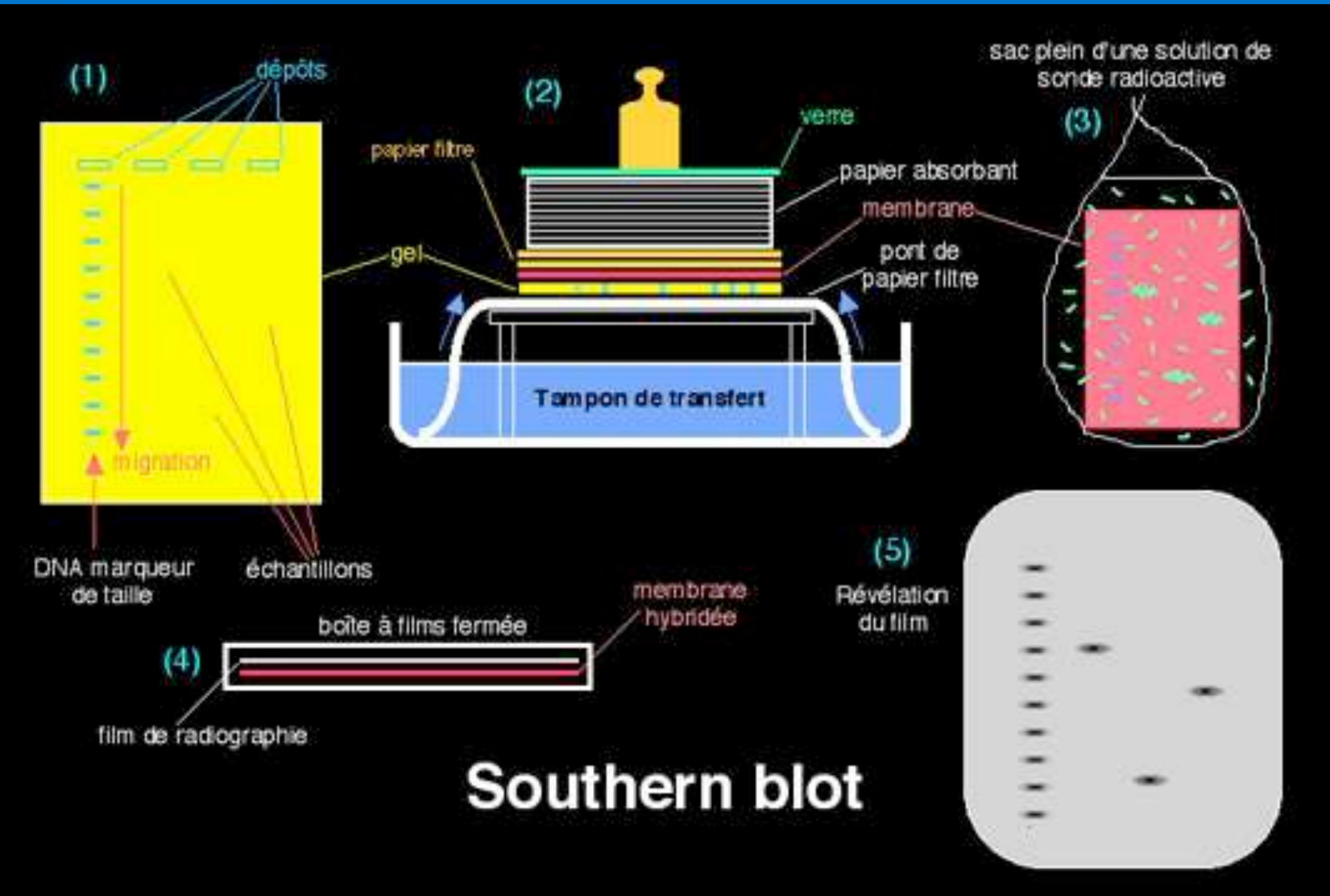
Selon le type d'expérience

- **Les 2 populations de molécules peuvent être toutes 2 en solution, *ou***
- **l'une des populations peut être immobilisée**
  - **absorbée sur un filtre**
  - **incluse dans un chromosome**
  - **absorbée sur une membrane de *nylon* ou de *nitrocellulose***

1 des populations d'ADN monocaténaires est souvent immobilisée dans un *gel d'électrophorèse*

- Pour l'hybridation, on transfère l'ADN monobrin du gel à une membrane de nitrocellulose (*transfert* ou *blotting*) et on le fixe à la membrane par chauffage sous vide à 80°C.
- Quand l'ADN est fixé, on incube la membrane avec une sonde d'ADN (ou d'ARN) monocaténaire capable de s'hybrider à un groupe complémentaire de fragments.
- Les produits radioactifs non fixés sont éliminés et la sonde fixée est identifiée par autoradiographie *(Fig. 31).*

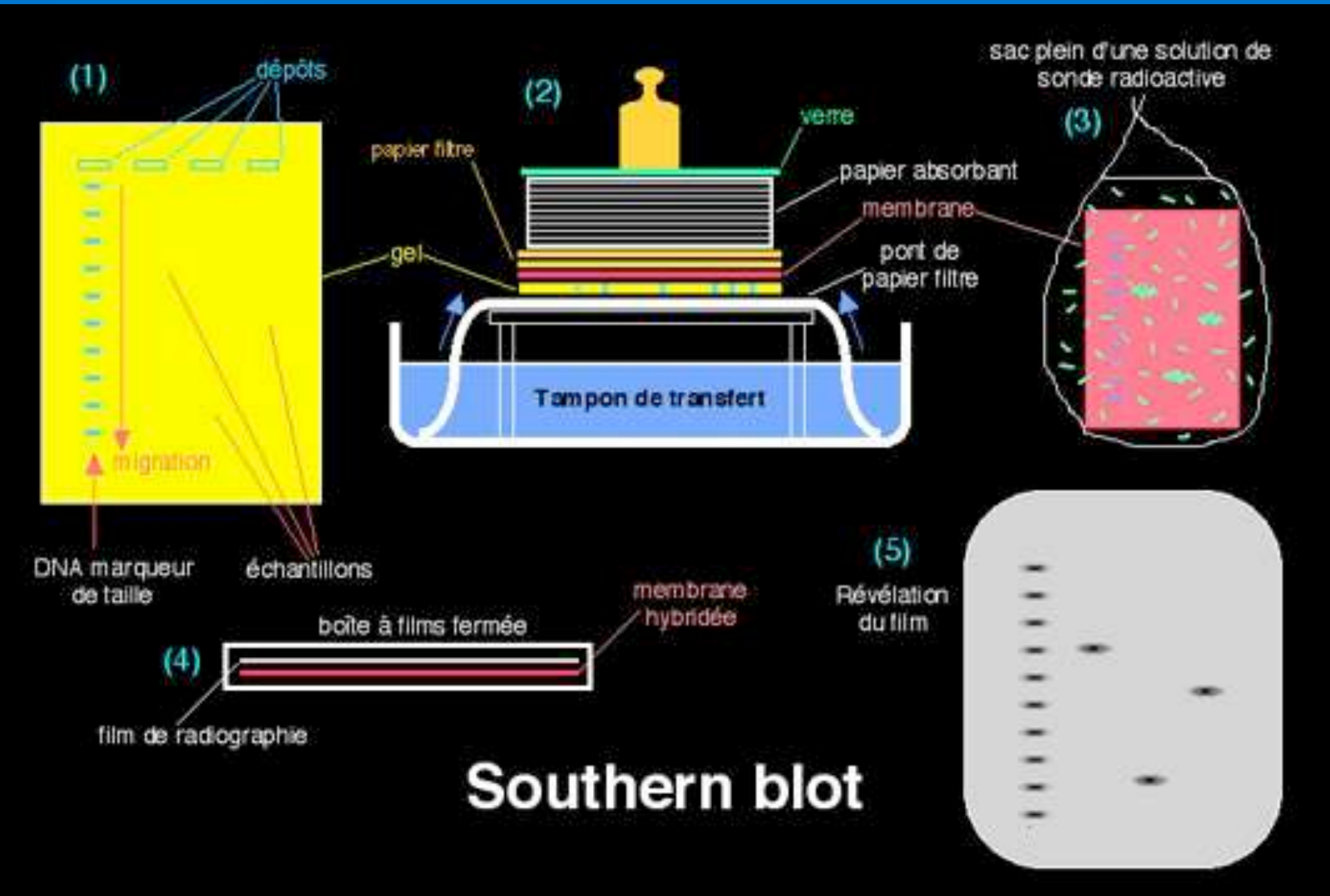
Figure 31. Localisation de fragments spécifiques d'ADN dans un gel par *transfert Southern*.



Localisation de fragments spécifiques d'ADN dans un gel par *transfert Southern*.

- Les fragments d'ADN séparés sont dénaturés,
- ils sont transférés sur une membrane de nitrocellulose qui est incubée avec les sondes marquées d'ADN (ou d'ARN), *et*
- la position des fragments hybridés est déterminée par autoradiographie.

Figure 31. Localisation de fragments spécifiques d'ADN dans un gel par *transfert Southern*.



- Dans le *transfert de Southern*, on peut identifier un ou quelques *fragments de restriction* qui possèdent une *séquence nucléotidique particulière*, même, s'il y a dans le gel, des milliers de fragments différents.

Transfert de Southern

= Technique qui permet d'identifier des fragments d'ADN spécifiques fractionnés par électrophorèse en gel.

4.2 – Amplification enzymatique de l'ADN par PCR (Réaction de Polymérisation en chaîne) :

- Lorsque l'on possède des informations (même partielles) sur la séquence d'un fragment d'ADN, on peut utiliser les propriétés d'une ADN-polymérase, *in vitro*, pour amplifier à l'infini ce fragment (recopier en plusieurs millions d'exemplaires un segment d'ADN qui peut être un gène).
- L'enzyme utilisée dans cette technique est une ADN polymérase thermostable appelée Taq polymérase, isolée à l'origine de *thermus aquaticus*, bactérie vivant dans les sources thermales à des températures supérieures à 90°C.

Dans le protocole le plus simple

- **on mélange un échantillon d'ADN**
  - à la *Taq polymérase*
  - aux 4 dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
  - à un excès d'amorces synthétisées à partir de la séquence de fragments d'ADN
- **Chaque amorce sera ensuite allongée par l'enzyme.**
- **Cette étape conduit à 2 copies de la séquence initiale**
- **Ces 2 copies sont ensuite *dénaturées* et les mêmes amorces sont utilisées pour initier un nouveau cycle d'élongation conduisant à 4 copies.**

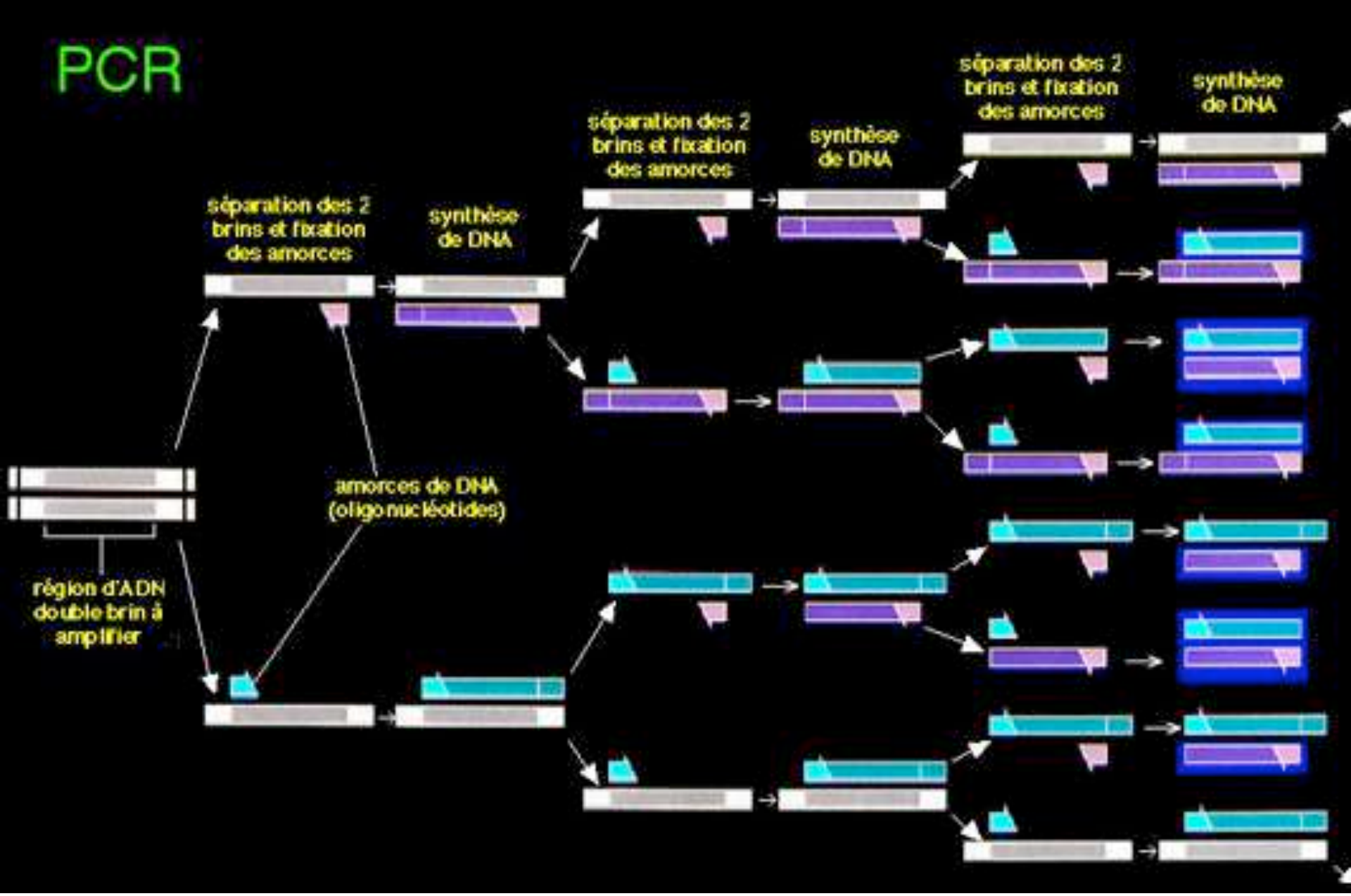


Figure 32. Réaction en chaîne de la polymérase (PCR).

Pratiquement, un thermocycleur permet de réaliser cette amplification sans intervention.

- **Après électrophorèse, une simple coloration permet de visualiser la bande correspondant au produit d'amplification.**
- **A chaque cycle le nombre de copies du fragment est doublé, soit 1024 molécules après 10 cycles et 1048576 au bout de 20 cycles !**

Perspectives humaines

- Cette méthode apporte actuellement de grandes possibilités en génétique humaine ; elle est rapidement devenue la méthode de base pour tout problème de détection de séquence :
  - empreintes génétiques
  - repérage d'OGM, etc….

Investigations criminelles

- obtenir des quantités d'ADN à partir d'une tache de sang laissée :
  - sur les vêtements d'un suspect, ou
  - à partir de l'ADN d'un cheveu resté sur le lieu d'un crime
- Pour cela, on amplifie des régions du génome choisies pour leur important polymorphisme, de telle sorte que deux individus n'auront jamais des fragments d'ADN de même taille.

4.3 - Séquençage d'ADN

- **4.3.1 - Méthode chimique (de *Maxam* et *Gilbert*)**
- **4.3.2 - Méthode enzymatique = par terminaison de chaîne (de *Sanger-Coulson*)**

4.3.1 - Méthode chimique (de Maxam et Gilbert)

- Le fragment d'ADN est marqué (^{32}P) à l'extrémité 5' et traité par un *réactif chimique* approprié.
- Ceci entraîne des coupures spécifiques.
- Après migration dans un gel, seules les molécules qui débutent à l'extrémité 5' radioactive sont visualisées.

4.3.2 - Méthode par terminaison de chaîne (de Sanger-Coulson)

- **Population de fragments d'ADN identiques (traitement de l'ADN / 1 enzyme de restriction)**
  - longueur maximale 500 paires de bases
- **La préparation est ensuite divisée en quatre échantillons qui sont chacun traités de façon un peu différente :**

- L'ADN de tous les échantillons est dénaturé en brins monocaténaires (1)
- Incubation avec :
  - un court oligonucléotide marqué radioactivement qui est complémentaire de l'extrémité 3' d'un des fragments monocaténaires (2)
  - ADN polymérase
  - les quatre désoxyribonucléosides triphosphates précurseurs (dNTP)
  - une faible concentration d'un précurseur modifié, appelé *didésoxyribonucléoside triphosphate* ou *ddNTP*.

Séquençage de l 'ADN

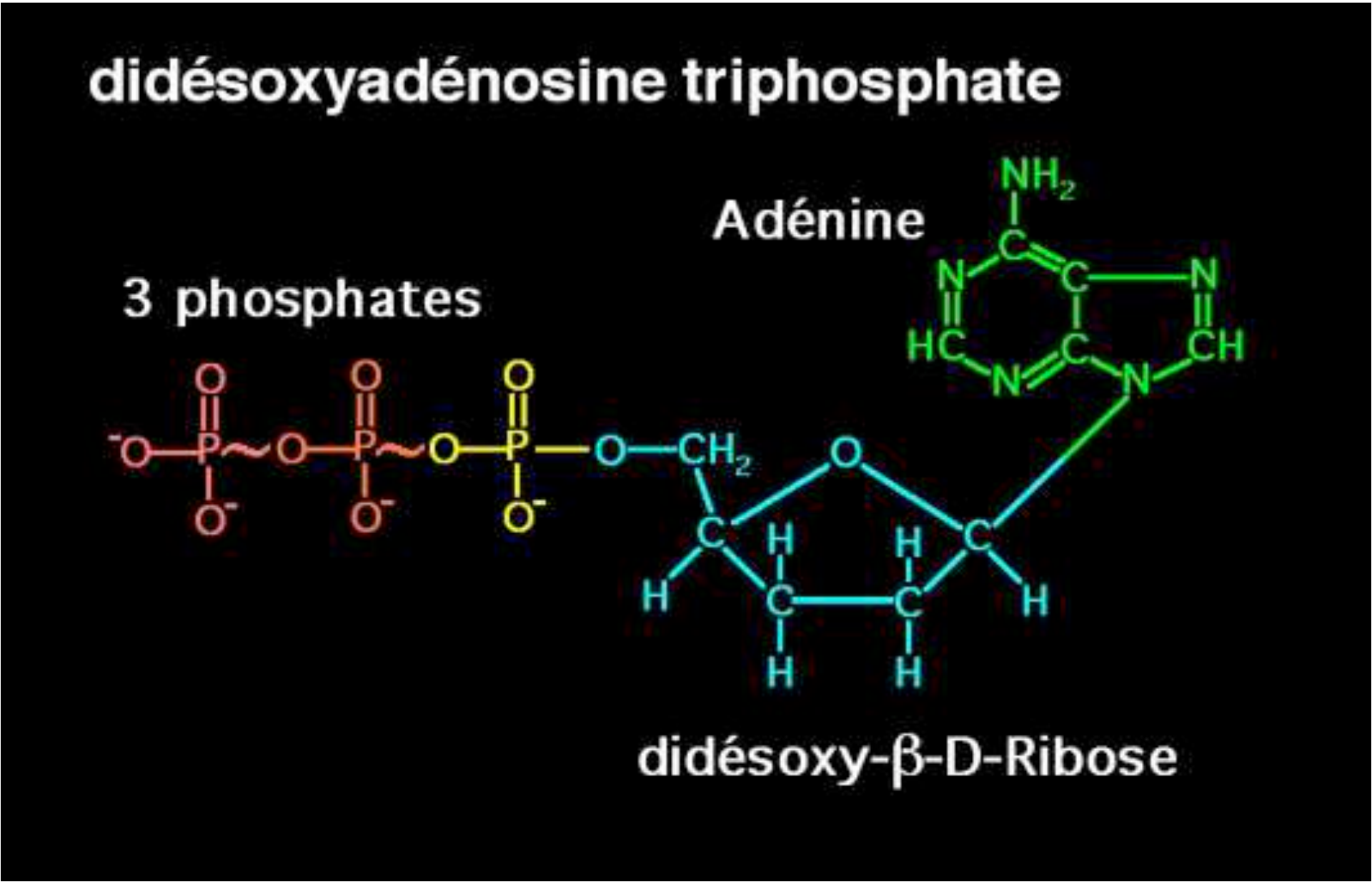
On donne, à chacun des quatre échantillons, un ddNTP différent (ddATP, ddGTP, ddTTP ou ddCTP)

Fichier Word

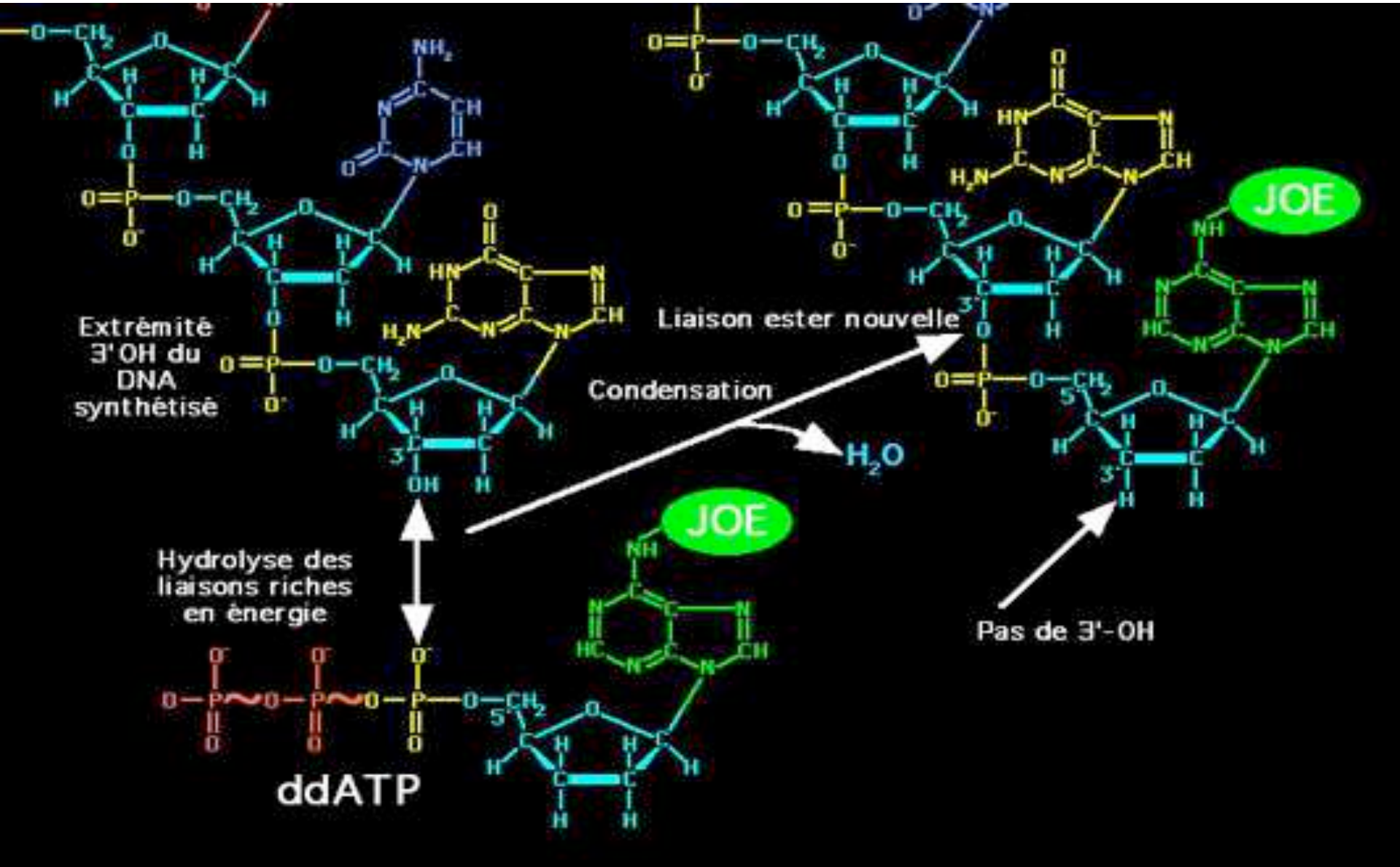
Si les mélanges réactionnels sont incubés dans des conditions appropriées,

- **l'oligonucléotide marqué* s'unit aux extrémités 3' des fragments monocaténaires (3)**
- **et il sert d'*amorce* pour l'addition de nucléotides à une chaîne complémentaire qui s'allonge.**

Les ddNTP n'ont pas de groupement OH en 2' et 3'



quand un de ces nucléotides a été incorporé à une chaîne en croissance, l'absence d'OH 3' empêche la polymérase d'ajouter un nouveau nucléotide et entraîne la terminaison de la chaîne (4).



Puisque le ddNTP est beaucoup moins concentré dans le mélange que le dNTP correspondant, l'incorporation du didésoxyribonucléotide est rare et aléatoire, il peut être :

- incorporé à proximité de l'origine d'une chaîne,
- du milieu d'une autre chaîne,
- à la fin d'une troisième

- **GGAGATTCGAGCTddG**
  GGAGATTCGAddG
- **GGAGATTCddG**
- **GGAddG**

Quel que soit le moment où le ddNTP est incorporé, la croissance de la chaîne cesse à

cet endroit

- Chacun des quatre échantillons renferme une population de fragments d'ADN marqués radioactivement incomplets
  - de longueurs différentes
  - tous se terminant au même nucléotide.
- Les fragments des quatre échantillons se terminent par 4 dNTP différents.

Séquençage de l'ADN. Séquençage de Sanger-Coulson (didésoxy).

- GGAGddA
- GGAGATTCGAGCTGddA
- GGAGATTCGddA

- GGAGATTCGAGCTddG
- GGAGATTCGAddG
- GGAGATTCddGGGAddG

- GGAGATTCGAGddC
- GGAGATTddC

- GGAGATTCGAGCddT
- GGAGATddT
- GGAGAddT

4.3.3- Séquençage automatique

- Le séquençage du DNA est devenu aujourd'hui automatisé grâce à une variation de la méthode de Sanger-Coulson, dans laquelle l'amorce utilisée pour chaque réaction est marquée par des molécules non radioactives, notamment fluorescentes de couleurs différentes.

milliers de nucléotides en qq H

“ *génome humain* ”

- Ce qui a permis d’envisager des projets de grande ampleur, notamment, celui nommé “ *génome humain* ”
- dans lequel les trois milliards de paires de bases du DNA d’une cellule humaine seront séquencées.

Séquençage automatique

Bon courage

LIENS UTILES ☝

Visiter :

1. https://biologie-maroc.com
   - Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. https://biologie-maroc.com/shop/
   - Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
   - Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
   - Trouver des bourses et des écoles privées

3. https://biologie-maroc.com/emploi/
   - Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
   - Trouver des offres d'emploi et de stage