

METHODES D'ETUDE DES ACIDES NUCLEIQUES

1. Techniques d'extraction et de purification

- 1.1. Préparation d'extraits bruts acellulaires
- 1.2. Purification par extraction phénol-chloroforme
- 1.3. Minipréparation de plasmide
- 1.4. Concentration par précipitation à l'éthanol froid en présence de cations
- 1.5. Purification par centrifugation sur chlorure de césium
 - 1.5.1. Séparation ADN / ARN : centrifugation isopycnique sur gradient de chlorure de césium
 - 1.5.2. Maxipréparation de plasmides par centrifugation isopycnique sur chlorure de césium en présence de BET
- 1.6. Purification par chromatographie
 - 1.6.1. La chromatographie d'adsorption sur colonne de silice
 - 1.6.2. La chromatographie sur colonne d'échange d'anions
 - 1.6.3. Purification des ARN messagers eucaryotes par chromatographie d'affinité

2. Conservation des acides nucléiques

- 2.1. Conservation de l'ADN
- 2.2. Conservation de l'ARN

3. Quantification des acides nucléiques

- 3.1. Absorptiométrie UV
- 3.2. Fluorimétrie
- 3.3. L'électrophorèse sur gel et coloration au bromure d'éthidium

4. Méthodes d'étude du génome : techniques de base

- 4.1. Les enzymes de restriction
- 4.2. Electrophorèse : analyse de fragments d'acides nucléiques
 - 4.2.1. Principe général de l'électrophorèse analytique
 - 4.2.2. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)
- 4.3. L'hybridation moléculaire : concepts de base
 - 4.3.1. Définitions (hybridation et T_m)
 - 4.3.2. Conditions de l'hybridation moléculaire
 - 4.3.3. Calcul de la T_m
 - 4.3.4. Différentes méthodes d'hybridation : en milieu liquide, sur support solide, in situ
- 4.4. La PCR = « *Polymerase Chain Reaction* » : amplification de séquences d'ADN
- 4.5. Le séquençage de l'ADN : détermination de la séquence d'un acide nucléique
- 4.6. Les méthodes de recherche de séquences nucléotidiques
 - 4.6.1. Le Southern blot
 - 4.6.2. Les puces à ADN
 - 4.6.3. Le dot blot

<http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/techgen/html/pcr.htm>

<http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/>

<http://www.chups.jussieu. /polys/biochimie/BGbioch/POLY.Chp.9.25.html>

<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?>

[WO=1997%2F35002&IA=WO1997%2F35002&DISPLAY=DESC](http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=1997%2F35002&IA=WO1997%2F35002&DISPLAY=DESC)

« Biochimie et biologie moléculaire » de Kamoun , 2003, Médecine-Sciences Flammarion pages 122 et suite

« Principes de biologie moléculaire en biologie clinique » de Nedjma Ameziane, Marc Bogard, Jérôme Lamoril - 2005

1. Techniques d'extraction et de purification

Il existe différents protocoles expérimentaux pour **extraire les acides nucléiques**, qui suivent approximativement le **même schéma de principe** :

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines et des lipides
- Elimination d'un acide nucléique donné : en effet, un « extrait acides nucléiques » brut contient en mélange ARN, ADN génomique et ADN plasmidique pour les bactéries.

Il existe aujourd'hui des **kits commerciaux** permettant de réaliser **rapidement** l'extraction et la purification à l'aide de **réactifs prêts à l'emploi**.

1.1. Préparation d'extraits bruts acellulaires

→ Lyse des cellules

Pour **lyser** les cellules on peut utiliser soit un **système mécanique** soit un **système chimique** suivant le type de cellules concerné.

Lyse mécanique :

Pour la lyse mécanique, on utilise de préférence des **méthodes ou systèmes** qui ne dénaturent pas l'ADN, entendre **qui ne « cassent » pas les molécules d'ADN**. Il faut donc que la méthode utilisée ne génère pas trop de forces de cisaillement : **on utilise le choc thermique (cycles de congélation/décongélation) ou le choc osmotique**.

On délaisse les méthodes d'agitation ; on délaisse aussi l'emploi des ultra-sons.

Ces méthodes ne sont pas adaptées à l'extraction d'ADN à partir des cellules procaryotes. En effet, les traitements mécaniques utilisés pour casser des cellules procaryotes doivent être beaucoup plus draconiens que ceux utilisés pour les cellules eucaryotes (presse de French, broyeur à bille, ...) : les bactéries, cellules de petite taille peuvent se glisser entre les faisceaux de forces de cisaillement et sont donc parfois très difficiles à lyser mécaniquement. Les traitements mécaniques employés pour les procaryotes sont donc trop dénaturant pour l'ADN. **La lyse mécanique est préférentiellement réservée aux cellules eucaryotes.**

Lyse chimique :

Pour les cellules procaryotes on préférera une lyse chimique.

* Fragilisation enzymatique des parois de cellules bactériennes, végétales et fongiques

La paroi est un obstacle majeur à la lyse cellulaire. Pour rendre efficace la désorganisation de la membrane plasmique, des hydrolases spécifiques peuvent être employées :

Organisme	Bactérie	Champignon	Végétaux
Type de paroi	Peptidoglycane	Chitine	Cellulose, Hémicellulose, Pectines
Enzyme	Lysozyme	Chitinase	Cellulase, Hémicellulase, Pectinase

Ce traitement crée des brèches dans la paroi. Avec la **perte de protection assurée par la paroi contre la forte pression osmotique intracellulaire**, la **cellule gonfle** (afflux d'eau vers l'intérieur de la cellule) jusqu'à **rupture de la membrane plasmique**.

* On réalisera obligatoirement une lyse chimique pour extraire sélectivement les plasmides des bactéries, voir plus tard la description du protocole de minipréparation de plasmides. Les conditions de cette lyse chimique permettent de récupérer dans le lysat uniquement les plasmides sans l'ADN génomique, on parle alors de lysat clair. Pour arriver à cette extraction sélective la lyse chimique est obligatoire, la lyse mécanique ne permet d'obtenir qu'un lysat brut c'est-à-dire qui contient à la fois ADN génomique et plasmides.

* Désorganisation des membranes par des détergents et solubilisation des lipides membranaires
Sodium Dodécyl Sulfate (**SDS**) appelé aussi laurylsulfate de sodium, **triton X100**, sarcosyl sont des **détergents qui vont solubiliser les lipides membranaires sous forme de micelles**. Cela permet de créer des pores membranaires suffisamment larges pour libérer le contenu du cytoplasme hors des cellules.

Suivant leur force (chargés ou pas), les **détergents vont aussi plus ou moins dénaturer les protéines membranaires**. La dénaturation des protéines de la membrane plasmique contribue également à la lyse de la cellule.

→ Elimination des protéines

Cette **étape sera très importante pour l'élimination des histones eucaryotes**. On peut procéder de deux façons différentes.

Déprotéinisation par hydrolyse enzymatique :

Elle est réalisée en faisant agir une **endoprotéase non spécifique** comme la **protéinase K**, active jusqu'à 65°C c'est donc une enzyme très stable. Cette digestion est **souvent conduite en présence d'un détergent dénaturant comme le SDS**. Le SDS, en plus de solubiliser les lipides et contribuer à la lyse de la cellule, **facilite l'action de la protéinase K car il déploie la chaîne protéique**.

Précipitation des protéines en utilisant un agent chaotrope :

On parle aussi de déprotéinisation par **défécation**.

Un agent chaotrope est **un sel (donc des ions) qui modifie la solubilité des molécules (protéines ou acides nucléiques)** et qui peut **provoquer leur précipitation**. Certains sont **dénaturants d'autres pas**.

L'agent chaotrope peut agir de plusieurs façons :

- **Neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité.**
- **Interférer dans les interactions que les protéines établissent avec l'eau et modifier la solubilité des protéines.** L'agent chaotrope entre en compétition avec la protéine pour établir des interactions avec les molécules d'eau disponibles dans la solution. L'eau en se liant à l'agent chaotrope prive la protéine des molécules d'eau qui l'hydrataient (la solvataient), la protéine sort alors de la solution et précipite.
- pour certains, il peut aussi **dénaturer les protéines**, on le qualifie alors de **dénaturant précipitant**. Par exemple pour les protéines, il provoque la **rupture des liaisons hydrogènes qui maintiennent leur structure tertiaire** entraînant ainsi le **démasquage de leurs régions hydrophobes**. Les **régions hydrophobes ont tendance à s'agréger** et les **protéines précipitent** (défécation).

On peut citer comme agent chaotropiques :

- des **agents chaotropiques qui ne dénaturent pas les protéines** : le **chlorure de sodium (NaCl) à forte concentration** et le **sulfate d'ammonium**, qui lui est largement utilisé dans la purification des protéines ;
- des **agents chaotropiques dénaturant** pour les protéines, le **perchlorate de sodium (NaClO₄)**, le **thiocyanate de guanidine (TCG)**, l'**iodure de sodium (NaI)** et le **chlorure de lithium**.

Les agents chaotropiques **les plus utilisés** sont le **thiocyanate de guanidine (GTC)** et l'**iodure de sodium (NaI)**. En effet, ces **agents chaotropiques par leur action dénaturante** sur les protéines **assurent deux fonctions à la fois** :

- disloquer les membranes des tissus en agissant sur les protéines membranaires et conduire donc à la **lyse des cellules** ;
- et **éliminer les protéines en provoquant leur précipitation**.

Après centrifugation, il reste peu de protéines dans le surnageant qui contient, lui, tous les acides nucléiques.

→ Réactifs divers ajoutés au tampon d'extraction

NB : Lorsqu'on utilise les agents chaotropiques pour éliminer les protéines par précipitation, on ajoute quelque fois dans le tampon d'extraction des **thiols** pour **empêcher la reformation de ponts disulfures des protéines qui restent ainsi à l'état dénaturé**.

NB : Une **forte concentration saline** (NaCl 0,15 M) du milieu d'extraction empêche la séparation des deux brins de l'ADN en formant un **écran protecteur de contre-ions autour de la double hélice** : les ions Na⁺ s'associent avec les groupements phosphate PO₄⁻, les neutralisent et diminuent les forces de répulsion qui s'exercent entre les deux brins de même charge électrique, les ions Na⁺ stabilisent ainsi la structure en double hélice. Le **citrate de sodium et l'acétate de sodium** aussi utilisés dans les tampons d'extraction jouent le même rôle = **stabiliser l'ADN natif c'est-à-dire sous sa forme bicaténaire**.

N.B. : Le tampon contient souvent une substance chélatrice telle que l'**EDTA** qui séquestre par complexation les ions divalents ou le **citrate** qui possède 3 groupements carboxyle qui s'ils sont chargés COO⁻ piègent les ions positifs. Ces deux réactifs sont utilisés pour piéger notamment le **magnésium, cofacteur des DNases et RNases** afin de **mieux préserver les acides nucléiques par inhibition des nucléases**.

→ Elimination des ARN lors de l'extraction de l'ADN

Les extraits acellulaires bruts contiennent les deux types d'acides nucléiques : ADN et ARN.

On peut hydrolyser les ARN de deux façon, par :

- **Hydrolyse chimique** avec **NaOH**. A **pH alcalin l'ARN est hydrolysé et pas l'ADN** qui est protégé de la lyse alcaline par l'absence de groupement hydroxyle en 2' sur le désoxyribose (*voir cours structure des acides nucléiques*).
- Mais on préfère souvent opérer par **digestion enzymatique**. Pour diminuer la concentration en ARN par digestion à la RNase, on utilise une **RNase « DNase free »**, c'est-à-dire dépourvue d'activité DNase ; pour cela les DNases contaminant éventuellement les préparations de RNase du commerce sont dénaturées par un chauffage (par exemple 5 min à 100°C) auquel résiste la **RNase, enzyme particulièrement thermostable**. La RNase est **souvent apportée dès le début de l'extraction-purification grâce à sa grande stabilité**.

1.2. Purification par extraction phénol-chloroforme

□ **Principe de la méthode d'extraction** : les méthodes utilisent la solubilité différentielle des molécules (acides nucléiques / contaminant comme les protéines et les lipides) entre deux phases non miscibles.

□ **En pratique** : on mélange vigoureusement la solution d'acides nucléiques en phase aqueuse à une phase non miscible hydrophobe. Après centrifugation, on récupère la phase aqueuse contenant les acides nucléiques à la pipette (phase aqueuse = phase supérieure).

□ **Deux extractions successives** qui se distinguent selon la phase non miscible :

* *l'extraction phénolique* : elle est utilisée pour débarrasser les acides nucléiques des protéines car le **phénol est un déprotéinisant puissant**. Les **protéines précipitent**, elles sédimentent au fond de la phase aqueuse mais et elles **restent à l'interface** c'est-à-dire qu'elles restent à la surface de la phase phénolique qui est une phase hydrophobe. Les **débris membranaire lipidiques vont aller dans la phase phénol hydrophobe**.

Le phénol doit être très pur et saturé en tampon (pH 8 pour extraire l'ADN). L'inconvénient du **phénol** réside dans son **caractère très corrosif**, c'est donc un produit à **manipuler avec précaution**.

* *l'extraction au chloroforme* : elle complète toujours l'extraction précédente pour éliminer toutes traces de phénol aqueux. Toute trace de phénol doit être éliminée pour permettre l'action ultérieure d'enzyme (de restriction par exemple) sur l'acide nucléique extrait. Le chloroforme est additionné d'**alcool isoamylique** (AIA = 3-méthyl-1-butanol = $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) qui est un **agent anti-mousse stabilisant la séparation des phases** (agent déstabilisant de l'émulsion).

NB : Lors de la préparation d'un extrait ADN, **l'élimination de l'ARN peut être effectué à la fin ou avant l'étape phénolique**. S'il est effectué après l'étape phénolique, ce traitement doit être suivi d'une deuxième déprotéinisation afin d'éliminer la RNase résiduelle.

Remarque : **L'extraction phénol-chloroforme appliquée à la purification de l'ARN = extraction phénol acide-chloroforme**

L'extraction des ARN nécessite de prendre des **précautions particulières** : port de gants, matériels et réactifs à usage unique traités sans ribonucléases. Ces précautions sont mises en place pour remédier à la présence de ribonucléases sur la peau et à l'existence de tissus naturellement enrichis en ribonucléases (pancréas par exemple). **L'extraction des ARN est donc plus délicate que celle de l'ADN** car les **ARN sont très sensibles à l'action des RNases qui**, de leur côté, **sont des enzymes très stables** et qui donc, même si elles sont présentes en petite quantité, réaliseront la dégradation des ARN.

→ L'extraction débute par une lyse cellulaire ou tissulaire **en présence d'agent chaotrope**, **isothiocyanate de guanidine ou de chlorure de lithium**, l'agent chaotrope est utilisé pour **dénaturer les RNases endogènes**. On y ajoute souvent un **inhibiteur de ribonucléases** comme le **β -mercaptoéthanol** ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) qui est un **agent réducteur** et qui va rompre les ponts disulfures dénaturant ainsi les ribonucléases. (*Il est communément employé pour réduire les ponts disulfures présents dans les protéines et peut jouer un rôle d'antioxydant biologique*).

→ La lyse est ensuite suivie par une **extraction en phénol acide**. Le phénol utilisé est un **phénol acide** c'est-à-dire qu'il a été mis en solution et équilibré avec un tampon de pH acide (pH 5). Dans ces conditions les **protéines histones, riches en acides aminés basiques (portant dans leur radical un groupement NH_2)**, vont avoir à **pH acide une forte charge positive (cf. NH_3^+)**, elles vont alors **s'associer plus fortement à l'ADN génomique chargé négativement et vont l'entraîner avec elles lors de leur précipitation**.

Ainsi l'ADN et les protéines qui ont précipité restent à la surface de la phase phénolique et sont ainsi rassemblés à l'interface. La phase aqueuse (supérieure) contiendra en solution les ARN débarrassés de l'ADN. La phase phénolique (inférieure) contiendra les lipides.

Voir planche

NB : D'autres techniques rapides ont été élaborées sans l'utilisation du phénol acide-chloroforme : purification sur mini-colonne contenant une membrane de gel de silice présentant une affinité pour les ARN avec élimination des ADN par l'emploi d'une DNase. (Voir article VWR bioMarke 2009)

1.3. Minipréparation de plasmides

La préparation d'ADN plasmidique à partir de bactéries est l'une des techniques les plus courantes de la biologie moléculaire, également connue sous le nom abrégé de [miniprep](#).

Le principe de l'extraction est connu sous le nom de **lyse alcaline**. Cette méthode permet de préparer sélectivement l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien.

Le principe de cette méthode consiste effectuer la lyse des cellules au moyen d'un **détergent** = SDS (dodécyl sulfate de sodium) **en présence de soude**, à **pH 13**. A ce **pH très alcalin**, l'ADN est **dénaturé**, c'est-à-dire que les deux brins de la double-hélice sont séparés. En effet, les groupements phosphate sont tous chargés négativement à pH basique et les forces de répulsion entre les deux brins sont à leur maximum.

On neutralise ensuite rapidement la solution, ce qui provoque la renaturation brutale (réappariement des brins du duplex d'ADN). L'ADN chromosomique, très long (quelques Méga (10^6) paires de base), ne parvient pas à se réappairier complètement et forme des enchevêtrements insolubles. L'ADN plasmidique, court ($\sim 10^3$ paires de base), parvient à se reformer et reste en solution.

On sépare alors les espèces par centrifugation. Les protéines précipitées, sont également éliminées avec le détergent et l'ADN chromosomique. **Cette solution ne contenant que très peu d'ADN chromosomique et de protéines est appelée lysat clair.**

L'ADN plasmidique est ensuite concentré par précipitation à l'alcool.

1.4. Concentration par précipitation à l'éthanol froid en présence de cations (effet écran)

□ Précipitation à l'alcool éthylique :

- Avant l'ajout du solvant alcool il est impératif d'ajouter, à la solution d'acides nucléiques, une **quantité importante de cations** (apport Na^+ sous forme NaCl), on travaille à **haute force ionique (NaCl 3 M)**. Les cations Na^+ **neutralisent les groupements PO_4^-** répartis tout le long de l'ADN ou de l'ARN et forment un **écran protecteur de contre-ions autour de la double hélice**, l'acide nucléique **devient moins soluble** car il **établit moins d'interactions avec l'eau**, il est moins hydraté = solvaté \Rightarrow on désigne cette situation par l'appellation « **effet écran** ».

- La **précipitation est réalisée par addition** de l'**éthanol moins polaire que l'eau**. Il faut **ajouter à un volume de solution, au moins deux volumes d'éthanol**.

- On récupère les acides nucléiques sous forme solide après **centrifugation**.

- Le **précipité est lavé avec de l'éthanol à 70 %** pour se débarrasser des sels qui passent en solution dans les 30 % de la phase aqueuse de l'éthanol de lavage.

- Puis le précipité est séché. Le **séchage est obligatoire** pour **éliminer l'éthanol qui pourrait empêcher la dissolution ultérieure du précipité**.

- Après le séchage obligatoire, les acides nucléiques pourront être **resolubilisés dans un tampon adéquat** (souvent tampon TE = Tris-EDTA pH 8).

□ Précipitation à l'isopropanol :

Le principe est le même que précédemment sauf que le **sel n'est pas nécessaire** et que les **petits fragments d'ADN sont éliminés car non précipités**. Dans ce cas, on procède à un **mélange volume à volume**. Le **précipité sera également lavé pour éliminer les traces d'isopropanol** puis séché.

Voir planche

NB : L'ADN génomique étant de haut poids moléculaire, il **peut former de très longues fibres** qui se répandent dans l'éthanol de manière spectaculaire (« méduse » d'ADN). On utilise l'**affinité de l'ADN pour la silice** : voir plus loin purification de l'ADN par chromatographie sur colonne de silice) pour **enrouler ces fibres sur une baguette de verre**. En enroulant les fibres de l'ADN autour de la baguette de verre, une **grande partie de l'ARN peut être éliminée à ce stade** car les **molécules d'ARN, petites molécules, ne s'enroulent que très peu**.

1.5. Purification par centrifugation sur chlorure de césium

1.5.1. Séparation ADN/ARN par centrifugation isopycnique sur gradient de chlorure de césium

Une solution de chlorure de césium (CsCl) de densité donnée **soumise à une force de gravité intense forme spontanément un gradient de densité continu**. La résolution de tels gradients atteint le centième d'unité de densité.

Les molécules ajoutées à la solution de CICs vont se placer, au cours de la migration, dans la zone du gradient dont la densité est la même que la leur. D'où l'appellation isopycnique du grec *iso* = égal et *puknos* = dense.

Cette technique **permet de distinguer l'ADN natif c'est-à-dire double brin de l'ADN dénaturé (simple brin) et de l'ARN (lui aussi monocaténaire)**. En effet, il ya des **liaisons possibles entre des groupements ionisés de l'intérieur de la molécule d'ADN et le chlorure de césium qui est lui aussi chargé (Cs⁺)**. Il y a davantage de liaisons qui s'établissent quand l'ADN est dénaturé ou avec l'ARN car il y a davantage de groupements ionisés libres pour fixer les ions Cs⁺. Donc en présence de chlorure de césium, **l'ADN dénaturé ou l'ARN seront plus denses que l'ADN natif**.

La présence de CICs provoque ainsi la fixation différentielle d'ions Cs⁺ sur ces macromolécules et leur densité apparente est alors modifiée : protéine = 1,3g/ml ARN = 1,75-1,89g/ml ADN = 1,6-1,79g/ml.

Ces macromolécules sont alors aisément séparées lors de la centrifugation.

Ce type d'ultracentrifugation est très résolutif mais d'un maniement délicat.

Voir planche

Remarque : Purification de l'ARN par centrifugation sur coussin de chlorure de césium

L'extraction d'ARN est un sujet plus complexe car les **ribonucléotides sont des molécules très vulnérables, facilement dégradées**. Elles sont en effet **très sensibles aux ribonucléases (RNases) qui elles sont très stables**, ce qui impose de **prendre des précautions particulières** aussi bien dans le recueil et la conservation des échantillons que dans la mise en œuvre des procédures d'extraction.

Les tissus ou les cellules, frais ou congelés dans l'azote liquide, sont homogénéisés le plus rapidement possible dans un **tampon qui doit inhiber très fortement les RNases endogènes et dissocier les protéines des acides nucléiques**.

Le tampon contient en général :

- un **détergent** (SDS),
- un agent dissociant dit encore **agent chaotropique**, le thiocyanate de guanidine, qui précipite les protéines et inhibe en même temps les RNases,

- et un **agent réducteur**, le 2-mercaptoéthanol ou le dithiothréitol, ce sont des inhibiteurs des RNases ou des enzymes en général car ils hydrolysent les ponts disulfures présents dans les protéines et provoque ainsi leur dénaturation (ponts disulfures = liaison covalente établie entre deux acides aminés soufrés cystéine ou méthionine : S-S devient SH + SH sous l'action de l'agent réducteur).

L'ARN monocaténaire lie davantage de molécules de chlorure de césium que l'ADN génomique bicaténaire, l'ARN présente alors une densité supérieure. En raison de sa densité, seul l'ARN peut traverser les coussins de CsCl et être récupéré dans le culot. L'ARN est ensuite lavé dans l'acétate de sodium et précipité à l'alcool.

Voir planche

1.5.2. Maxipréparation de plasmides par centrifugation isopycnique sur gradient de chlorure de césium en présence de BET

La méthode traditionnelle de purification **en maxipréparation** est la **centrifugation isopycnique en gradient de chlorure de césium et en présence de bromure d'éthidium (BET) saturant.**

→ Lors de l'extraction des acides nucléiques, le **chromosome très grand est « cassé »** et les **fragments linéaires prennent une forme relâchée**, les **plasmides beaucoup plus petits sont préservés et conservent une structure surenroulée.**

→ Le BET **s'intercale entre les bases de l'ADN**, son incorporation **allège la macromolécule.**

Deux raisons à cet abaissement de densité de l'ADN associé au BET :

- le BET est une molécule peu dense ;
- en s'intercalant le BET va provoquer une augmentation du volume occupé par la molécule d'ADN mais la masse de ce dernier est peu modifiée donc la densité de la molécule d'ADN est diminuée (le *BET agit comme s'il faisait « gonfler » l'ADN*).

Le BET **s'intercale entre les bases de l'ADN en proportions différentes selon le type d'ADN :**

- les fragments linéaires de l'ADN chromosomique incorporent beaucoup de BET ;
- l'ADN plasmidique surenroulé n'incorpore au contraire que peu de BET.

→ Les **ions césium (Cs⁺) interagissent également avec les acides nucléiques.**

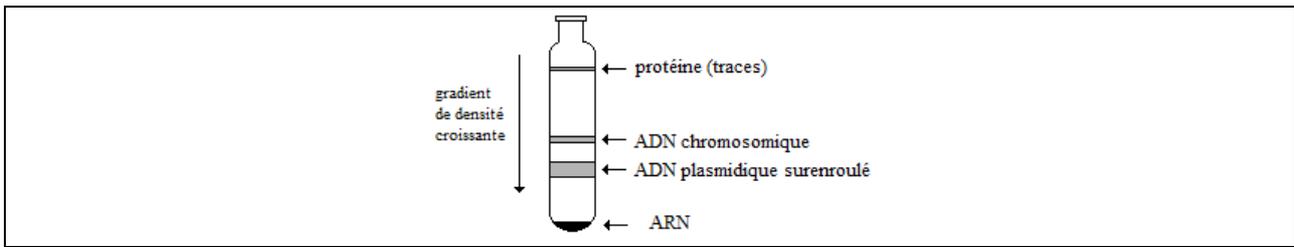
⇔ Les différentes interactions établies et leurs conséquences sur la densité des macromolécules nucléiques sont les suivantes :

- L'ADN chromosomique établit alors des liaisons avec les ions Cs seulement au niveau des groupements ionisés externes, par contre il établit beaucoup de liaison avec le BET, il est allégé.
- L'ADN plasmidique établit lui aussi des liaisons avec les ions Cs seulement au niveau des groupements ionisés externes, par contre il établit peu de liaisons avec le BET en raison de sa configuration surenroulée, il n'est pas allégé.
- L'ARN n'établit pas de liaison avec le BET car il est monocaténaire, par contre il établit beaucoup de liaisons avec les ions Cs, car tous les groupements ionisés sont accessibles, ce qui, en raison de la densité des ions césium, l'alourdit.

Il en résulte que **l'ADN plasmidique est alors nettement plus dense que l'ADN chromosomique en condition saturante de BET.**

L'emploi de **bromure d'éthidium permet donc d'augmenter la différence de densité entre l'ADN super-enroulé et l'ADN relâché/linéaire** et d'obtenir une **séparation optimale.**

Le lysat clair est soumis à une ultracentrifugation : par exemple 48 heures à 150 000 xg.



Inconvénients :

La technique est **lourde à mettre en œuvre** et nécessite par ailleurs une **ultracentrifugeuse extrêmement coûteuse**. Cette technique n'est pas du tout adaptée à la routine. La technique n'est évidemment **pas automatisable**. De plus, les **agents chimiques utilisés sont toxiques**. L'**élimination du BET est délicate** (extraction au butanol). Pour **éliminer les ions césium on réalise une dialyse** au travers d'une membrane perméable à l'eau et aux ions contre un gros volume de tampon.

1.6. Purification par chromatographie

Les deux techniques, **chromatographie sur colonne de silice** et **chromatographie sur colonne d'échange d'anions**, sont les deux techniques les plus employées pour purifier les acides nucléiques.

Un **grand nombre de kits commerciaux** qui proposent différentes variantes ou améliorations des méthodes décrites précédemment **contiennent souvent des petites colonnes** de résine **chromatographique** échangeuse d'anions ou de silice, **permettant d'améliorer la pureté**.

La chromatographie sur colonne met en œuvre 5 étapes :

1. équilibration de la colonne → travail en tampon et force ionique adéquats
2. fixation de la molécule à purifier
3. lavage de la colonne → on élimine ce qui n'est pas fixé
4. élution → on décroche ce qui a été fixé
5. régénération → retour état départ de la colonne ou tampon de conservation

1.6.1. La chromatographie d'adsorption sur colonne de silice

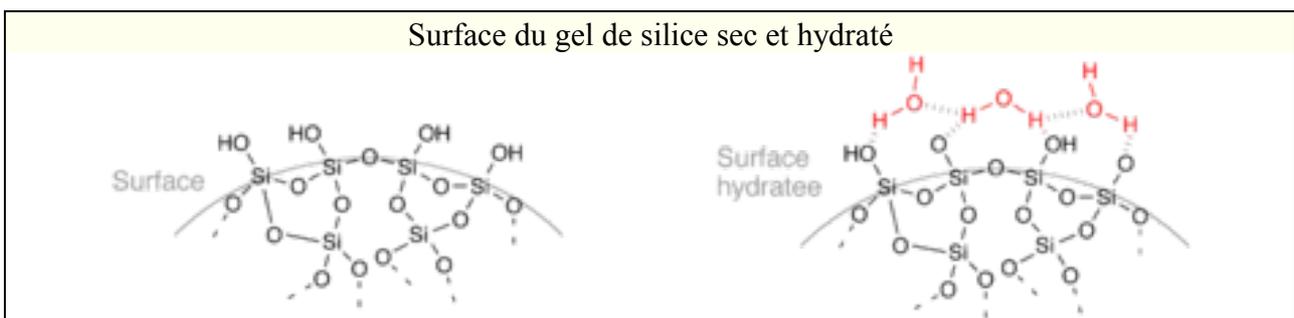
Cette technique est actuellement largement utilisée et des kits d'extraction basés sur ce principe sont proposés par de nombreux fournisseurs, adaptés à de nombreux échantillons.

* Le support :

La silice est un composé chimique (dioxyde de silicium) et un minéral de formule SiO_2 .

Le **gel de silice** est un **polymère d'acide silicique $\text{Si}(\text{OH})_4$** préparé à partir de silicate de sodium.

Elle se dissout dans l'eau sous la forme de $\text{Si}(\text{OH})_4$, l'acide silicique (acide faible), la limite de solubilité étant de 0,140 g/l à 25°C.



* Les interactions :

Il s'agit d'une **chromatographie par adsorption**. La **fixation de l'ADN sur la silice** fait intervenir des **interactions dipôle-dipôle (interaction hydrogène)**.

* Les étapes de la chromatographie :

② L'**adsorption sélective** d'acides nucléiques sur membrane de gel de silice n'est obtenue que si l'on travaille dans les conditions suivantes :

- **en présence de concentrations élevées d'agents chaotropiques** ou par exemple à **force ionique élevée** ([NaCl] élevée),
- et en présence d'**alcool**.

L'agent chaotropique intervient comme compétiteur dans les relations que l'ADN établit avec l'eau. L'agent chaotropique se lie à l'eau et l'ADN devient moins hydraté. L'ADN établit alors des liaisons avec la silice et se fixe au support de la colonne.

③ La colonne est lavé par de l'éthanol, solvant moins polaire que l'eau qui ne risque pas de décrocher l'ADN.

④ **L'ADN est élué par un tampon à basse force ionique**. On peut utiliser un tampon avec une faible concentration en sels ou de l'eau pure, l'ADN va à nouveau établir des liaisons avec l'eau, s'hydrater et repasser en solution.

1 et 2 → sont réalisées à **force ionique élevée** : on neutralise les groupements phosphate PO_4^- de l'ADN avec Na^+ (il devient moins soluble).
3 → la colonne est lavée en présence d'**éthanol** qui est un solvant moins polaire que l'eau (l'ADN ne repasse pas en solution)
4 et 5 → on utilise de l'eau ou un tampon de **force ionique très faible** (exemple avec de l'EDTA)

Voir planche

* La silice peut être proposée sous forme de gel sur colonne ou sous forme de billes :

- Dans le cas d'une **colonne**, la séparation est effectuée par **centrifugation**. Ce procédé est basé sur l'emploi de petites colonnes adaptées à des tubes de 1,5 à 2 mL (tube ependorff).
- S'il s'agit de **billes**, ce sont des billes **paramagnétiques** recouvertes de silice qui sont utilisées et la séparation sera effectuée à l'aide d'un **dispositif aimanté**.

* Avantages :

- Pas utilisation de substances toxiques si NaCl employé.
- Il n'est pas nécessaire de procéder à une précipitation alcoolique car l'ADN obtenu est de bonne qualité et donc prêt à l'emploi.
- La méthode est rapide et s'applique à toute sorte de spécimens.
- L'ADN obtenu à une taille de l'ordre de 20-30 kb pouvant aller jusqu'à 50 kb.

* Inconvénient :

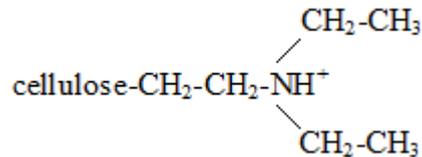
On ne peut donc obtenir par cette technique les fragments supérieurs à 50 kb nécessaires aux expériences de *blotting* ou de clonage.

1.6.2. La chromatographie sur colonne échangeuse d'anions

* Le support :

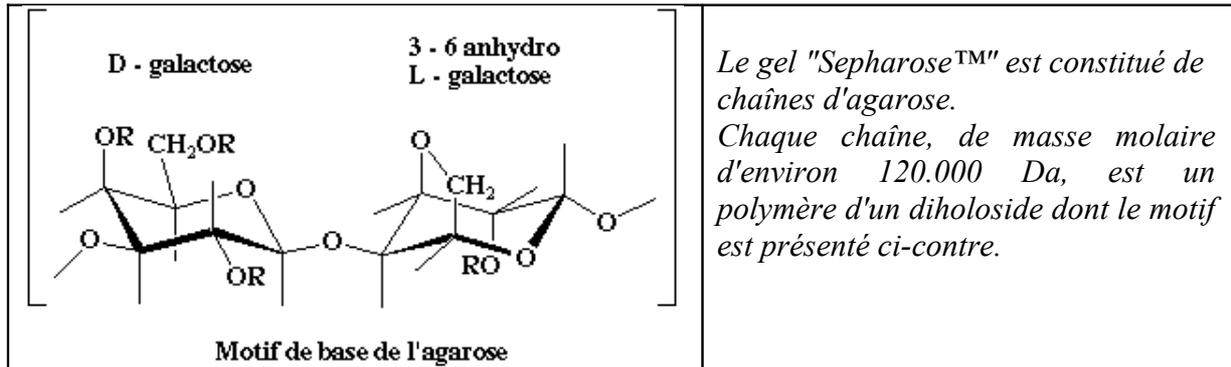
→ Un échangeur d'anions de **type DEAE cellulose** ou équivalents.

La diéthylaminoéthyl-cellulose (DEAE-cellulose) est un support échangeur d'anions, obtenu en substituant la cellulose (cellulose = polymère de molécules de glucose liées en β 1-4) par des groupements diéthylaminoéthyls :



Le DEAE est un échangeur faible, possédant des groupements issus d'une base ou d'un acide faible, de façon à ce que le support soit sous forme ionisée ou neutre.

→ Un échangeur d'anions de **type Q-sepharose** qui **comporte l'ion ammonium quaternaire R_4N^+** (désigné par la lettre Q) = un atome d'azote portant une charge positive et dont les 4 valences sont occupées chacune par un radical R. L'ammonium quaternaire est un échangeur fort issu d'une base ou d'un acide fort qui est donc tout le temps ionisé.



* Les interactions :

La chromatographie par échange d'anions est basée sur l'**interaction entre les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN et les charges positives du support de chromatographie**. Après **échange de l'ion (avec Cl⁻ par exemple)**, la rétention de l'ADN fait intervenir des **interactions ioniques**.

* Les étapes de la chromatographie :

Le **dépôt du lysat** sur la colonne de chromatographie est réalisé dans des conditions de **basse concentration en sels**, on veut que l'ADN expose de nombreuses charges négatives c'est-à-dire que les groupements phosphate ne soient pas neutralisés par des ions positifs contenus dans le tampon. **L'ADN se fixe à la colonne à l'aide de liaisons ioniques**. Ensuite, les protéines, les débris cellulaires et les autres molécules en solution sont éliminés par lavage à l'aide d'un tampon moyennement chargé en sels. **L'ADN est finalement élué à l'aide d'un tampon à haute force ionique** (solution concentrée de NaCl). Afin d'éliminer les sels, l'ADN est précipité par de l'alcool.

1 et 2 et 3 → sont réalisées à force ionique basse ou moyenne 4 et 5 → sont réalisées à force ionique élevée (élution par compétition avec NaCl)

* Avantages :

- Aucune substance toxique n'est utilisée : intérêt pour une préparation ADN en vue d'une thérapie génique par exemple.
- L'ADN isolé d'une taille de 50-100 kb en moyenne peut atteindre 150 kb.

1.6.3. La purification des ARN messagers eucaryotes par chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité met en œuvre un **ligand spécifique**. *Voir planche*

La plupart des **ARNm eucaryotes possèdent une queue poly(A) en 3'** d'environ une centaine de nucléotides. Cette structure particulière est mise à profit pour les purifier par une **chromatographie d'affinité**.

La purification de l'ARN poly(A) se fait par passage sur une **colonne oligo(dT)** : oligo(dT) cellulose ou oligo(dT) fixé à des billes magnétiques.

2. Conservation des acides nucléiques

2.1. Conservation de l'ADN

L'ADN peut être conservé dans un **tampon (10mM Tris pH=8) additionné d'EDTA (1mM) à 4°C**.

- A pH 8, la dégradation de l'ADN est notablement plus faible qu'à pH 7.
- L'EDTA permet de chélater les ions divalents (nécessaires de les piéger pour inactiver les nucléases) et ils évitent aussi la croissance de microorganismes.

L'ADN peut être **également conservé à -20°C dans le même tampon** mais des **cycles successifs de congélation/décongélation entraînent des cassures des acides nucléiques de grande taille (>10kb)**. D'où la nécessité de réaliser des **fractions aliquotes pour la conservation** si nécessaire.

2.2. Conservation de l'ARN

Du fait de la très faible stabilité des ARN, les **échantillons sont stockés à -80°C après addition de 3 vol d'éthanol**. En l'absence de sels, ils restent en solution. Une aliquote représentative peut être prélevée après agitation puis ajustée à 0,3M d'acétate de sodium pH 5,2 qui provoque la précipitation de l'ARN brièvement à -20°C et collectée par centrifugation.

3. Quantification des acides nucléiques

3.1. Absorptiométrie UV

Voir planche

La quantification est effectuée par **spectrophotométrie**, les **bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement dans l'ultraviolet à 260 nm**.

* Correspondance $A_{260\text{ nm}}$ et concentration en acides nucléiques

La mesure de l'absorbance à 260 nm est une **méthode précise si l'ADN est pur et natif**. Cette méthode est **peu sensible**, et **ne peut pas être utilisée pour des concentrations inférieures à 250 ng / mL** ($A_{260\text{ nm}} = 0,005 \text{ UA}$).

Une unité d'absorbance à 260 nm (DO lue sur le spectrophotomètre) correspond à :

- une solution d'ADN double brin à 50 $\mu\text{g/mL}$
- une solution d'ADN simple brin à 37 $\mu\text{g/mL}$
- une solution d'ARN à 40 $\mu\text{g/mL}$

Attention !!! **Ces valeurs s'appliquent à des acides nucléiques parfaitement purs et en solution homogène**. Mais il est rarement nécessaire d'effectuer un dosage très précis et dans la pratique une simple estimation de la concentration suffit.

* Rapport $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$ et contrôle de la pureté d'une solution d'ADN

Les **protéines absorbent également à 260 nm** mais leur maximum d'absorption se situe, lui, à 280 nm. Ainsi, le **rapport $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$** constitue un **moyen d'apprécier une éventuelle contamination de la solution d'ADN** :

- un rapport compris entre 1,8 et 2 correspond à une solution pure d'ADN ;
- un rapport inférieur à 1,7 est le signe d'une contamination par des protéines ;
- un rapport supérieur à 2 est le signe d'une contamination par l'ARN.
- Une éventuelle contamination par du phénol peut être recherchée en mesurant l'absorption à 270 nm (*rarement pratiqué*).

NB : A mettre en relation avec le fait que ARN et ADNsb absorbent plus à 260 nm que ADNdb (effet hyperchrome) et avec le fait que les acides aromatiques des protéines absorbent à 280 nm.

3.2. Fluorimétrie

L'ADN peut aussi être dosé avec **plus de sensibilité et de spécificité** par fluorimétrie **après coloration par un fluorochrome spécifique** :

- Fluorochrome spécifique des paires de bases A-T ou G-C : Hoechst 3342, DAPI ;
- Fluorochromes intercalants : iodure de propidium, bromure d'éthidium ou acridine orange.

Cette technique est plus sensible que la spectrophotométrie. De plus il est **possible de travailler sur de plus faibles volumes (10 µL)**. Il faut disposer d'un **fluorimètre**.

Cette méthode présente cependant un inconvénient : elle est sensible à la composition en bases (le fluorochrome peut se fixer préférentiellement sur les ADN riches en A-T ou G-C). Le standard utilisé devra avoir une composition en GC proche de celle de l'ADN mesuré (les cellules eucaryotes ont une composition en GC de 39 à 46 %, en moyenne, et les cellules procaryotes de 26 à 77 %).

Cette technique ne quantifie pas l'ARN.

La fluorimétrie est **très largement utilisée en cytométrie de flux** pour quantifier l'ADN à l'intérieur de cellules individualisées.

3.3. L'électrophorèse sur gel et coloration au bromure d'éthidium

Voir planche-exercice

4. Méthodes d'étude du génome : techniques de base

4.1. Les enzymes de restriction *Voir planche*

→ Ce sont des **endonucléases** capables de **couper l'ADN double brin** à des **sites spécifiques** de 4 à 6 paires de bases (parfois plus).

→ Les **séquences reconnues** comportent 4 à 10 nucléotides et **sont le plus souvent palindromiques**, c'est-à-dire que le site de restriction **présente un centre de symétrie**, ce qui fait que la succession des nucléotides est identique pour le brin sens (lecture 5' → 3') et pour le brin anti-sens (toujours dans le sens de lecture 5' → 3'). (*exemple : radar ; elu par cette crapule*)

→ Les enzymes de restriction sont **isolées le plus souvent de bactéries**. Les bactéries utilisent ces **enzymes pour se défendre contre une invasion d'ADN étranger**, particulièrement d'origine virale. Le **mécanisme de défense des bactéries vis-à-vis des virus est appelé système de restriction-méthylation**. 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.

→ **Le nom des enzymes** correspond :

- à l'initiale du genre auquel appartient la bactérie pour la première lettre (en majuscule) ;
- suivie des deux premières lettres de l'espèce bactérienne (en minuscule) ;
- la variété est désignée par une lettre ou un nombre ;
- le chiffre romain représente le numéro d'ordre de découverte de l'enzyme chez l'espèce donnée.

→ **Deux types de coupure** peuvent se produire en fonction des enzymes :

- la coupure à **extrémités franches** dites aussi **bouts francs**, la coupure a lieu au milieu du palindrome ;
- la coupure à **extrémités sortantes** dites aussi **cohésives**, on parle aussi de coupures décalées, la coupure a lieu de part et d'autre du centre de symétrie.

→ **Ecriture du site de restriction** : il s'écrit **toujours dans le sens 5'→3'**, on peut l'écrire sous **forme simplifiée** en écrivant qu'un seul brin par exemple G/AATTC, il faut ensuite reconstituer l'autre brin par complémentarité et son niveau de coupure grâce au centre de symétrie.



→ Deux enzymes sont **compatibles** lorsqu'elles ont des **sites de restriction différents mais donnent naissance aux mêmes extrémités cohésives**.

Exemple : *Bam*H I et *Bgl* II

Enzyme de restriction	Site de restriction :	Extrémité des fragments obtenus après digestion :
<i>Bgl</i> II :	5' A/GATCT 3' 3' TCTAG/A 5'	5' A + GATCT 3' 3' TCTAG + A 5'
<i>Bam</i> H I :	5' G/GATCC 3' 3' CCTAG/G 5'	5' ...G + GATCC 3' 3' ...CCTAG + G 5'

→ Les enzymes de restriction **qui proviennent de deux souches bactériennes différentes et qui reconnaissent les mêmes séquences** sont appelées **isoschizomères** (ex. *Hae* III et *Bsu*R I).

iso = égal et *skizein* = fendre

NB : deux isoschizomères ne catalysent pas obligatoirement le même type de coupure.

→ **Conditions d'activité des enzymes de restriction** :

- Une unité d'enzyme de restriction est la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser complètement 1 µg d'ADN (ADN substrats : phage λ, SV40, T7...) en 1 heure dans des conditions optimales de température, pH et salinité, dans un volume de 50 µL.
- Les enzymes sont fournies à 10 - 20 U / µL (également disponibles à 40 - 80 U / µL), dans une solution contenant 50 % de glycérol.
- En pratique, il s'avère qu'un rapport de 1 U / µg est rarement satisfaisant, l'ADN testé n'étant pas aussi purifié que l'ADN substrat (cas d'une miniprep) ou l'action de l'enzyme n'étant pas aussi efficace (cas d'un ADN plasmidique surenroulé). On travaille couramment avec un rapport de 2 - 5 U / µg.
- La température d'incubation est, sauf exception, de 37°C.
- La durée d'incubation est fonction de la masse d'ADN et du nombre d'unités d'enzyme en présence. Elle est généralement de 1 à 2 heures. *Actuellement on a des enzymes plus rapides ½ heure d'action.*
- L'enzyme est accompagnée du tampon d'hydrolyse approprié, concentré 10 fois (10X). Plusieurs tampons sont fournis avec les enzymes de restriction, les différences portant essentiellement sur la salinité et sur le pH.
- Tous les tampons contiennent du Mg²⁺, cofacteur des enzymes de restriction.
- Les réactions se font généralement dans un volume de 10 - 20 µL sur des quantités d'ADN de 100 - 500 ng.
- L'arrêt de la digestion est réalisé, soit par chauffage (10 minutes à 68°C), soit par addition d'une solution de charge contenant du SDS et/ou de l'EDTA.

→ Les enzymes de restriction sont **largement utilisées dans le domaine de la biologie moléculaire** :

- pour **fabriquer des ADN recombinés**, c'est-à-dire des molécules résultant de la fusion de différents segments d'ADN : intégration d'un gène d'intérêt dans un vecteur génétique, ;
- utilisation des **sites de restriction comme marqueur sur l'ADN** : réalisation de cartographies de restriction, analyse de l'ADN pour la détection de mutations qui se traduisent par la disparition ou l'apparition d'un site de restriction conduisant à une variation

de la longueur des fragments de restriction (polymorphisme de longueur des fragments de restriction = RFLP = *restriction fragments length polymorphisme*),

4.2. Electrophorèse : analyse de fragments d'acides nucléiques

4.2.1. Principe général de l'électrophorèse analytique

Voir planche

→ Les acides nucléiques sont des **macromolécules polyanioniques uniformément chargées** à pH 8 qui vont pouvoir migrer sous l'effet d'un champ électrique : ils **migrent vers le pôle positif (anode)**.

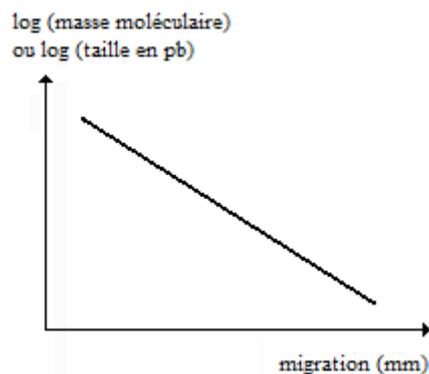
→ La **vitesse de migration** d'une molécule d'acide nucléique sera **fonction** :

- de sa **masse moléculaire** donc du **nombre de bases** (ou de paires de bases). **Plus une molécule sera de faible masse moléculaire, plus sa vitesse de migration sera grande.**

- de la **concentration d'agarose ou d'acrylamide** du gel.

→ La **migration est inversement proportionnelle au logarithme de la masse molaire exprimée en général en nombre de bases ou paires de bases**. Le gel est étalonné avec des fragments d'ADN ou d'ARN de taille connue.

La taille du (ou des) fragment(s) étudié(s) conditionnera le marqueur de taille utilisé pour servir de référence : on choisira un **standard de taille dont le produit de digestion contient un fragment ayant une taille proche de celle du (ou des) fragment(s) étudié(s)**. Le standard de taille est souvent constitué par les fragments de digestion d'un génome viral, ADN du virus lambda par exemple, ou d'oligonucléotides de synthèse de tailles adéquates



→ **Choix du support** :

- le **gel d'agarose** est le support le plus utilisé. Les tailles de fragments qu'il est possible de séparer sont comprises entre **0,1 et 30 kb**. La migration s'effectue en **position horizontale**.

- le **gel de polyacrylamide** est utilisé pour la séparation des petits fragments de **moins de 0,1 kb = 100 pb**. Le gel est coulé entre deux plaques de verre à l'abri de l'oxygène. La **migration est verticale**. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une méthode d'analyse plus résolutive car on peut séparer les fragments d'ADN à une base près. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est utilisée dans la méthode de séquençage de l'ADN (*voir paragraphe ultérieur*).

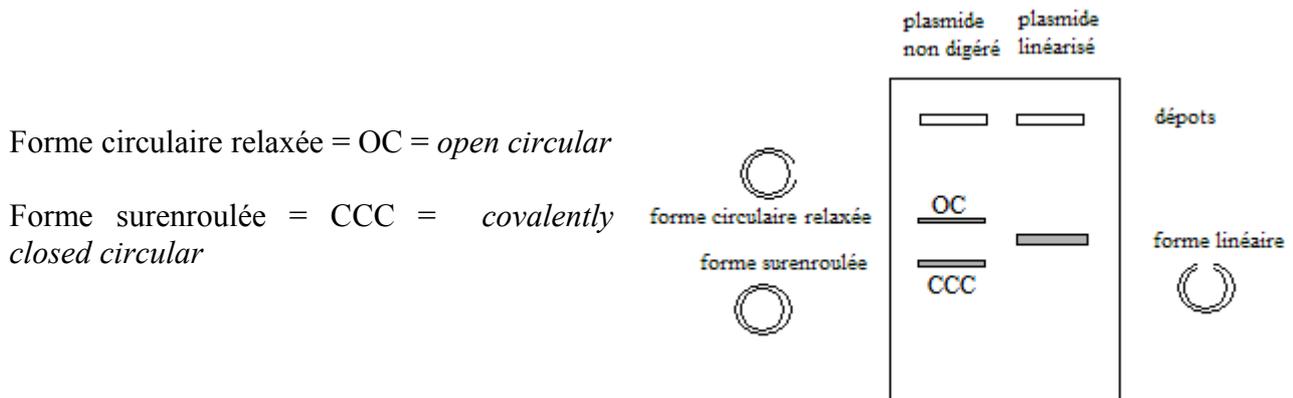
Voir planche : % agarose ou polyacrylamide et taille des fragments

→ **Visualisation des acides nucléiques :**

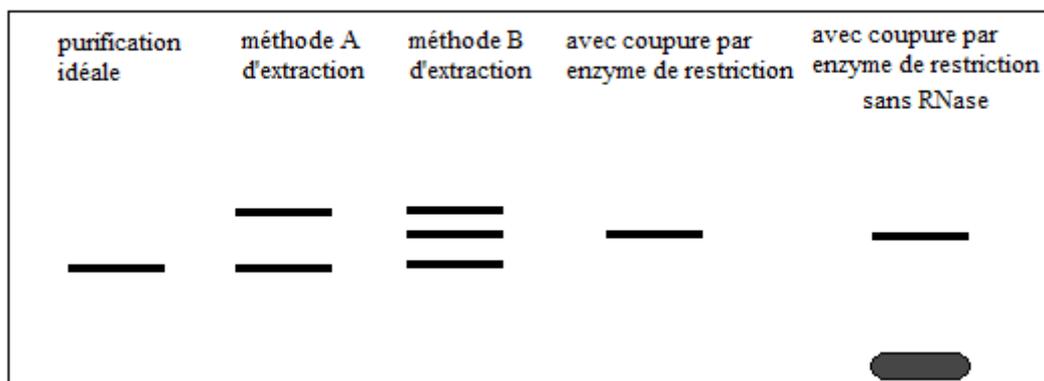
Les acides nucléiques sont visualisés par **coloration du gel au bromure d'éthidium (BrEt)** qui est un agent s'intercalant entre les plateaux de paires de bases et émettant une fluorescence orange lorsqu'il est éclairé par des UV courts (200-300nm).

→ Le **seuil de détection** est de l'ordre de quelques nanogrammes : **2 à 3 ng / bande**.

→ L'électrophorèse **permet aussi de séparer des molécules d'acides nucléiques suivant leur structure**, par exemple les **différentes formes d'un plasmide**.



Extraction d'un plasmide



Remarque : Electrophorèse des ARN eucaryotes

Les **ARN eucaryotes** sont le plus souvent des **molécules de taille importante** (> 0,8 kb) ; les gels utilisés seront donc d'**agarose**.

Les **ARN forment souvent des structures secondaires assez stables** qui **perturbent la migration électrophorétique** et **faussent l'estimation du poids moléculaire**. Alors les gels utilisés contiennent des **agents dénaturants** (ex : formamide) qui déstabilisent les appariements entre bases.

4.2. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)

→ **PGFE de l'anglais *Pulse Field Gel Electrophoresis***

On parle aussi d'électrophorèse en champ alterné (EGCA).

→ C'est une technique très utile pour l'**analyse des génomes eucaryotiques = analyse de grands fragments d'ADN**, particulièrement en liaison avec les technologies qui mettent à profit les enzymes de restriction. Cette technique **permet de séparer des fragments de très grande taille** (taille **supérieure à 20 kb**) qui ne sont pas séparés lors d'électrophorèses sur gel de type classique.

→ Le principe de cette électrophorèse consiste à **changer l'orientation et/ou la polarité du champ électrique alternativement au cours du temps**. A chaque modification du champ, la molécule d'ADN doit se réorienter parallèlement au nouveau champ. Le temps nécessaire à la réorientation est proportionnel à la longueur de la molécule. Lorsque le champ est rétabli dans son sens initial, la molécule doit une nouvelle fois se réorienter. **Ces temps de réorientation provoquent un retardement de la migration nette qui est proportionnel à la taille de la molécule.** (*parcours en zig-zag donc parcours plus long et on peut donc mettre en évidence petite différence de vitesse de migration*).

Le support de migration est un **gel d'agarose à 1%** et la **taille des fragments séparés est de l'ordre de 50 kb à quelques mégabases**.

→ La méthode est à ce point efficace que tous les **chromosomes de la levure** (22 chromosomes), et d'autres **champignons**, peuvent être séparés sur le même gel.

Les chromosomes de mammifères sont trop grands pour être séparés directement par PFGE). Heureusement, certains enzymes de restriction, que l'on pourrait qualifier de « parcimonieux », comme NotI, PvuI ou MluI, coupent les **ADN de mammifères en fragments** de 2000 à plusieurs centaines de milliers de kilobases qui, eux, peuvent être séparés par PFGE.

4.3. L'hybridation moléculaire : concepts de base

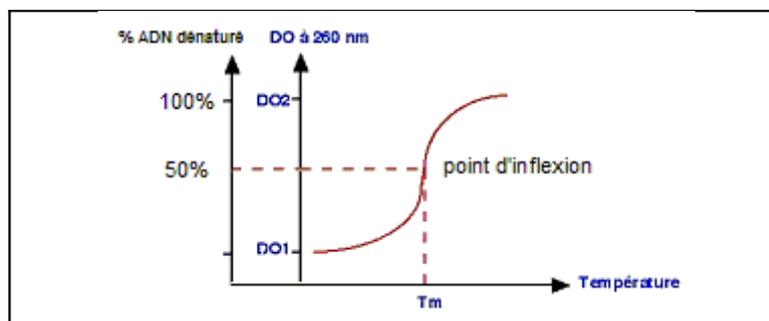
4.3.1. Définitions

→ **Hybridation** = association de brins complémentaires d'acides nucléiques (ADN/ADN ; ADN/ARN).

→ **Température de fusion ou T_m**

T_m = température à laquelle 50% des molécules d'acides nucléiques sont dénaturées (sous forme simple brin). (« **m** » pour « **melting** » en anglais = **fusion**).

On parle également de **température de demi-dénaturation**.



Remarque : Après la fusion, lorsque la température de la solution est abaissée juste au-dessous de la T_m, une réassociation des deux chaînes est obtenue (renaturation). Par contre, après la fusion, un refroidissement rapide permet d'obtenir des **simples brins relativement stables**.

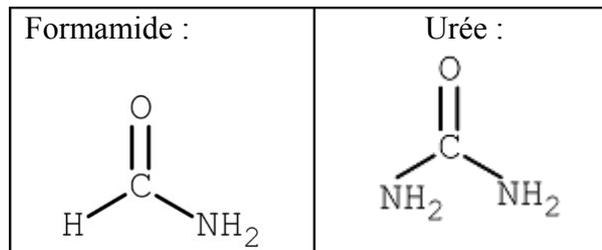
4.3.2. Conditions de l'hybridation moléculaire

Voir planche

→ L'hybridation moléculaire, et donc la valeur de la T_m, dépendent de nombreux facteurs :

- la longueur du fragment d'ADN considéré ;
- la richesse en cytosines et guanines ;
- la concentration en cation (Na⁺) du milieu réactionnel
- la concentration en agent dénaturant (ex : formamide, urée)
- le pH

- La **Tm augmente quand la longueur de l'ADN augmente** : plus l'ADN est long plus il y a d'interactions hydrogène à rompre.
- La **Tm augmente quand le pourcentage en GC augmente**. En effet, plus l'ADN est riche en paires GC plus le nombre moyen de liaisons hydrogènes par paires de bases à rompre est important (cf. 3 interactions hydrogène pour la paire GC contre 2 seulement pour la paire AT).
- La **Tm diminue quand la force ionique** (concentration du milieu réactionnel en cations, par exemple les ions Na^+) **du milieu diminue**. En effet, en neutralisant une partie des **charges négatives des groupements phosphates**, les cations **s'opposent aux forces de répulsion** qui existent **entre les deux brins**, les cations **stabilisent ainsi la double hélice**. Quand la **concentration en NaCl est faible**, l'ADN est **moins stable**, il faudra **moins chauffer pour provoquer la dissociation** des deux brins.
- La **Tm diminue quand le pH augmente**. A pH alcalin tous les groupements phosphates exposent une charge négative, les forces électrostatiques de répulsion augmente, la structure bicaténaire est moins stable, les deux brins se séparent plus facilement.
- La **Tm diminue en présence d'agent dénaturant comme la formamide ou l'urée**. La formamide est qualifiée d'agent dénaturant car elle agit comme un inhibiteur compétitif des interactions hydrogènes qui s'établissent entre les paires de bases. Les deux chaînes sont alors moins fortement associées, les deux brins se séparent plus aisément, l'ADN est dénaturé.



→ Stringence et hybridation spécifique

On désigne par **stringence** le **degré d'empêchement des hybridations non spécifiques**.

On dit également qu'**une solution est d'autant plus stringente qu'elle déstabilise l'ADN**.

Stringence Conditions expérimentales de température, de PH et de force ionique permettant l'hybridation moléculaire. La stringence est proportionnelle à la température et à l'inverse de la concentration en cations monovalents (Na^+ par exemple). Des conditions très stringentes (T° élevée, concentration en Na^+ faible) rendent l'hybridation moléculaire plus difficile mais permettent une hybridation spécifique tandis que des conditions peu stringentes (T° plus faible, concentration en Na^+ plus élevée) permettent une hybridation moins spécifique.

La stringence traduit le degré d'homologie des fragments à hybrider.

Dans des conditions de forte stringence, n'hybrident que des fragments de DNA homologues,

⇒ stringence élevée quand $[\text{NaCl}] \downarrow$ et température \uparrow .

Augmentation de la stringence ↔ déstabilisation de la double hélice ↔ diminution de la concentration en NaCl ou augmentation de la température ↔ hybridation spécifique

4.3.3. Calcul de la Tm

Voir planche

- Il est possible de mesurer directement la température de fusion d'un ADN double brin en **mesurant l'augmentation de l'absorbance de la solution à 260 nm en fonction de la température**. On travaille généralement **en présence de formamide** qui déstabilise les interactions hydrogène de l'ADN par compétition.
- Toutefois, on se contente la plupart du temps d'une **estimation à partir de la composition de l'oligonucléotide**.

$$T_m = 81,5 + 16,6 \cdot \log [Na^+] + 0,41 \cdot (\% GC) - 600/N - 0,63 \cdot (\% \text{ formamide})$$

4.3.4. Les différentes méthodes d'hybridation

Trois méthodes d'hybridation principales sont utilisées :

- ❖ l'hybridation en milieu liquide (hybridation en phase homogène) ;
- ❖ l'hybridation sur support solide (hybridation en phase hétérogène) ;
- ❖ l'hybridation in situ.

→ **L'hybridation en milieu liquide** est réalisée au cours de différentes techniques, comme l'amplification enzymatique in vitro (PCR voir plus loin), la mutagénèse dirigée, le marquage radioactif de sondes,

→ **L'hybridation sur support solide** utilise des membranes de nitrocellulose, ou des membranes synthétiques à base de nylon. L'immobilisation des séquences nucléotidiques, ce peut être la cible ou la sonde, sur la membrane permet une séparation simple par lavage des séquences non hybridées. Cette approche est utilisée dans différentes technique comme le Southern blot (voir plus loin), les puces à ADN,

→ **L'hybridation in situ** est utilisée pour repérer une séquence donnée d'ARN ou d'ADN à l'intérieur d'une cellule. Elle peut être réalisée sur :

- des coupes de tissus ;
- des chromosomes métaphasiques (localisation des gènes sur les chromosomes eucaryotes) ;
- des colonies bactériennes (permet de repérer les colonies recombinantes qui ont intégré le vecteur contenant la séquence d'intérêt lors d'une expérience de clonage de gène)

L'hybridation in situ est aussi appelée **technique FISH = Fluorescent In Situ Hybridation**

4.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) : amplification des séquences d'ADN

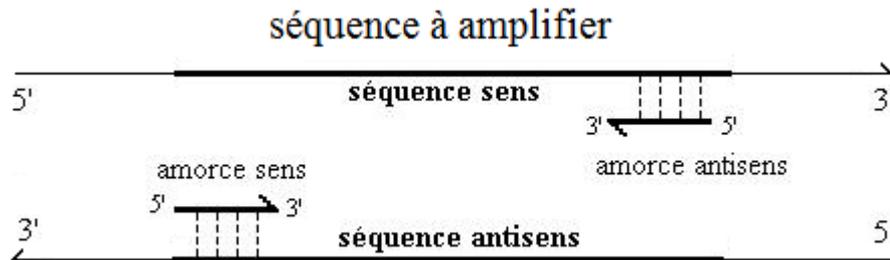
Polymerase Chain Reaction = PCR

→ Cette technique **permet d'obtenir un nombre important (jusqu'à un million) de copies d'une séquence choisie d'ADN**.

→ Il s'agit d'une méthode d'**amplification enzymatique in vitro**, par opposition à la méthode in vivo qui implique le clonage du fragment et l'amplification dans une bactérie (fragment à amplifier appelé insert introduit dans un plasmide puis plasmide recombinant introduit dans bactéries ; répllication des plasmides à l'intérieur de population bactérienne en croissance).

→ Cette technique implique qu'une partie de la séquence d'ADN soit connue. Il est nécessaire d'avoir des informations concernant les séquences flanquant l'ADN cible. A partir de ces informations, deux oligonucléotides d'environ 15 à 25 paires de bases sont élaborées. Ils doivent s'hybrider spécifiquement aux deux extrémités de la séquence à amplifier, chaque oligonucléotide se fixant à l'un des deux brins. Ces deux oligonucléotides servent d'amorces à une ADN polymérase.

L'ADN polymérase synthétise la chaîne d'ADN dans le sens 5' → 3' à partir de l'amorce (*primer*) et elle polymérise les nucléotides selon la séquence du brin matrice (*template*).
(amorce = petite séquence d'ADN simple brin ayant une extrémité 3'OH libre)



→ Cette technique a connu un essor considérable grâce à l'utilisation d'une ADN polymérase **thermostable**, évitant de rajouter de l'enzyme à chaque cycle.

Cette enzyme thermostable provient de microorganismes vivant dans des sources chaudes. L'ADN polymérase de *Thermophilus aquaticus*, appelée **Taq polymérase**, est largement utilisée. *Thermophilus aquaticus* est une bactérie thermophile des sources chaudes du parc de Yellowstone (Californie). La Taq polymérase est **résistante à l'ébullition** et est **active à 75-80 °C**. La Taq polymérase est **dépourvue d'activités d'édition** (5'→3' exonucléase et 3'→5' exonucléase). Parce qu'elle est dépourvue d'activités d'édition la Taq polymérase est **responsable de nombreux mésappariements** : de l'ordre de 1 pour 100 paires de bases.

La Taq polymérase fonctionne correctement à une **concentration en MgCl₂ de 2-3 mM**, au-delà elle produit davantage de mésappariements.

La Taq polymérase est **inhibée par les ions phosphates**.

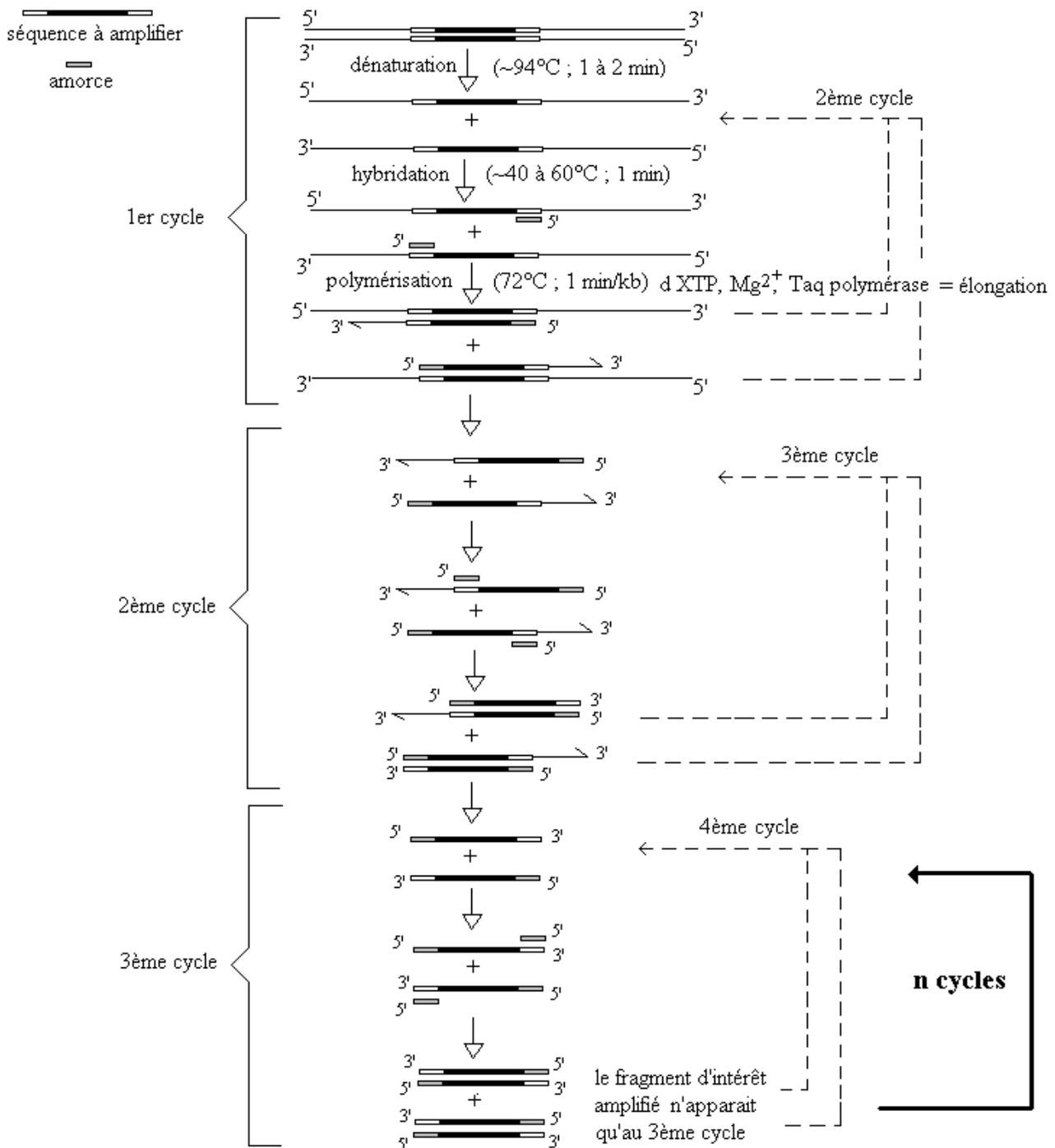
→ La PCR consiste en une **succession de 25 à 40 cycles**, chaque cycle comprenant :

- une **dénaturation** de l'ADN double brin (95- 98 °C) ;
- une **hybridation** avec les deux amorces spécifiques (entre 40 et 70 °C selon le T_m des oligonucléotides) ;
- une **extension des amorces** avec l'ADN polymérase (70-72 °C) = **élongation**.

→ Cette technique est une **réaction en chaîne** car les **brins d'ADN néoformés sont utilisés comme matrice pour les synthèses d'ADN suivantes**, pendant les 25 à 35 cycles consécutifs.

→ Les durées et les températures des trois réactions des cycles successifs sont contrôlées précisément dans un **thermocycleur automatique**.

→ *Schéma à savoir reproduire*



→ Ce n'est qu'à partir du 3ème cycle qu'apparaissent les fragments d'intérêt amplifiés (fragments de la taille attendue).

Les copies de la séquence cible peuvent être visualisées sous la forme d'une bande distincte d'une taille spécifique après électrophorèse du produit de la réaction de PCR dans un gel.

→ A la fin de chaque cycle, la quantité d'ADN a été multipliée par 2. Il s'agit donc d'une **amplification exponentielle**, théoriquement égale à 2^n pour n cycles d'amplification :

10 cycles : nombre de copies = $2^{10} = 1024 \sim 1000$; 30 cycles : on a $(10^3)^3 = 10^9$ copies.

En pratique, la quantité d'ADN est multipliée 100 000 à plusieurs millions de fois.

→ Le choix des amorces (*primers*) est crucial pour que la PCR soit réussie. **Le choix des amorces doit répondre aux critères suivants :**

- les températures de fusion T_m des amorces sens et antisens doivent être identiques ;

- la taille des amorces doit être comprise entre 12 et 30 nucléotides ;
- la distance entre les deux amorces sur l'ADN à amplifier doit être comprise entre 10 bp et 10 kbp ;
- le contenu en nucléotides G+C doit être compris si possible entre 40 et 60 % ;
- l'extrémité 3' doit se terminer de préférence par un T ;
- les séquences d'hybridation des amorces doivent être uniques ;
- les interactions des amorces entre elles sont à éviter ;
- les structures en épingle à cheveu sont à éviter.

→ La PCR est devenue de pratique courante dans la plupart des laboratoires de biologie moléculaire car elle ne requiert pas l'utilisation de produits radioactifs.

→ Les applications de la PCR sont nombreuses et il existe plusieurs variantes de la PCR, avec des buts différents :

- diagnostic des agents infectieux (hépatites (B, C et D), diagnostic des HIV) *exemple de performance actuelle = détection de 3 à 4 particules virales / mL de sang* ;
- étude des mutations ponctuelles ;
- séquençage direct des fragments amplifiés ;
- étude des anomalies cytogénétiques ;
- en criminologie, la PCR est très utilisée pour détecter des polymorphismes sur de faibles quantités (1 µl de sang ou quelques cheveux) ;
- détection des événements rares, tels la présence de 1 % de cellules tumorales ou la détection d'une faible quantité de cellules (10^{-4} , 10^{-5}) après un traitement par chimiothérapie ou greffe de moelle.

4.5. Le séquençage de l'ADN : détermination de la séquence d'un acide nucléique

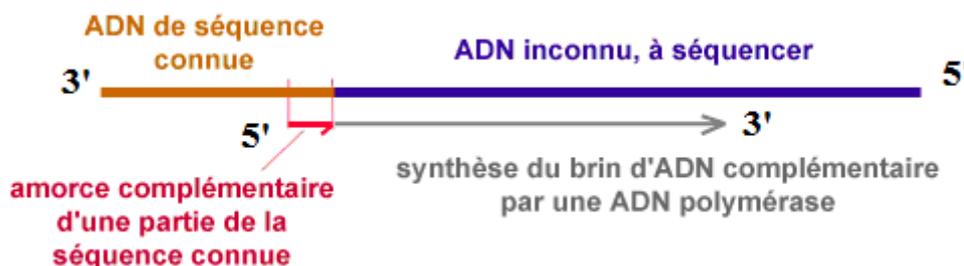
→ La détermination de la séquence d'un acide nucléique est actuellement extrêmement simple à réaliser grâce aux progrès technologiques et aux moyens informatiques modernes.

La détermination de la totalité de la séquence d'un certain nombre de génomes est réalisée, celle du génome humain (environ 3,5 milliards de paires de bases) est aujourd'hui connue à plus de 90 %.

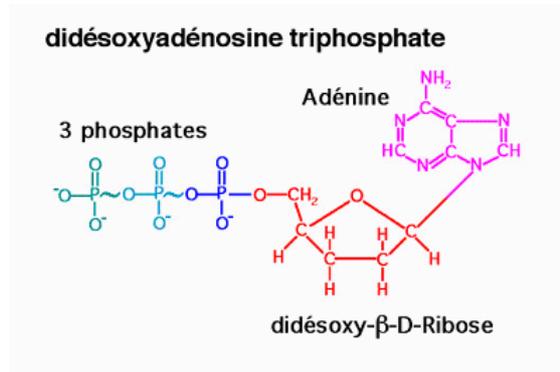
→ Actuellement, la méthode enzymatique par les didésoxynuléotides, la méthode de Sanger, est la plus répandue.

→ La réaction de séquençage est une technique de synthèse d'ADN analogue à la PCR. Le principe général de la technique consiste à effectuer la synthèse de multiples brins d'ADN complémentaires du brin dont on veut déterminer la séquence.

Pour lire la séquence d'un ADN simple brin on hybride une amorce du côté 3' de cet ADN. Puis on effectue avec une ADN polymérase la synthèse d'un brin complémentaire.



→ L'astuce consiste à utiliser des didésoxynucléotides (ddNTP), analogues structuraux des désoxynucléosides triphosphates, mais ne possédant pas de groupement OH en 3'. L'extension de la chaîne est stoppée après l'incorporation d'un ddNTP du fait de l'impossibilité de former la liaison phosphodiester.



→ Quatre réactions sont menées en parallèle dans quatre tubes.

Tous les tubes contiennent :

- l'ADN à séquencer,
- les quatre désoxyribonucléosides triphosphates dont un est radioactif,
- une amorce,
- et une ADN polymérase.

En outre, chacun des tubes contient un didésoxyribonucléotide particulier à faible concentration :

- ddATP pour la réaction A,
- ddTTP pour la réaction T,
- ddCTP pour la réaction C,
- ddGTP pour la réaction G,

Pour chaque tube, on obtient un ensemble de molécules dont la longueur dépend de la position du nucléotide complémentaire du didésoxynucléotide introduit.

Le contenu de chacun des tubes est déposé sur un gel de polyacrylamide (quatre pistes contiguës). La résolution du gel est telle que l'on peut distinguer deux brins d'ADN dont la longueur ne diffère que d'un seul nucléotide.

Le gel est séché puis soumis à une autoradiographie.

On peut donc lire de haut en bas la séquence du brin d'ADN complémentaire et en déduire facilement la séquence du brin matrice.

Voir planche et exercice donné en cours

→ **Technique semi-automatique utilisant des fluorochromes.** *Voir planche*

Il existe actuellement des **séquenceurs automatiques** d'ADN qui utilisent les **quatre didésoxynucléosides triphosphate** marqués chacun avec un **fluorochrome différent** (vert pour didésoxyA, bleu pour didésoxyC, jaune pour didésoxyG et rouge pour didésoxyT).

On réalise alors **une seule incubation et une seule migration** au lieu de quatre car les **didésoxynucléotides**, sous l'action d'un laser d'excitation, seront **repérés par une émission de fluorescence de couleur différente**.

L'**électrophorèse** peut s'**effectuer en continu** car les bandes d'ADN sont détectées grâce à l'incorporation à l'extrémité terminale du didésoxynucléotide fluorescent spécifique.

L'**analyse par ordinateur** des signaux permet d'établir la séquence.

On obtient ainsi des séquences de 300 à 800 bases sans ambiguïté.

4.6. Les méthodes de recherche de séquences nucléotidiques

4.6.1. Le Southern blot :

Le Southern blot est une **technique mise au point par Edward M. Southern en 1975 pour rechercher des fragments de DNA sur une électrophorèse** en les hybridant avec une sonde complémentaire. On l'appelle aussi technique du **buvardage de Southern** (l'appellation anglaise tire son nom du vocable *blot* signifiant buvard).

Voir planche et demander à voir animation en TD informatique

→ Les étapes :

Préparation de l'ADN à étudier

- Digestion par une enzyme de restriction adéquate
- Séparation des fragments par électrophorèse
- Dénaturation de l'ADN par incubation du gel d'électrophorèse dans une solution de soude
- Transfert de l'ADN sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon par un flux de liquide entraînant l'ADN :
 - Une feuille de membrane en nitrocellulose (ou encore en nylon) est placée sur le gel.
 - Une pression est appliquée au gel en plaçant une pile de serviettes de papier et un poids sur la membrane et le gel.
 - Ceci va permettre une montée par capillarité du tampon imprégnant le gel. Ce déplacement de liquide entraîne l'ADN qui va ainsi se fixer à la membrane de nitrocellulose (ou de nylon).
- Fixation covalente de l'ADN sur la membrane par cuisson (nitrocellulose) ou exposition aux U.V courts (nylon).

Préhybridation

Avant contact avec la sonde, on préincube la membrane avec de l'ADN (ADN de sperme de saumon) pour saturer tous les sites qui n'ont pas été occupés par l'ADN lors du transfert.

Hybridation

On ajoute la sonde dénaturée à la solution d'hybridation.

La température d'hybridation étant définie par la T_m de la sonde utilisée (soit $\sim 65^\circ\text{C}$ pour une sonde de + de 100 bases).

La sonde est marquée de sorte qu'elle puisse être détectée, habituellement par incorporation de la radioactivité ou en "étiquetage" de la molécule avec un fluorophore. Dans certains cas, la sonde peut être faite à partir d'ARN, plutôt que d'ADN.

Lavages

Le lavage élimine la sonde en excès.

Autoradiographie

Dans le cas d'une sonde radioactive, on met la membrane en présence d'un film radiographique vierge dans une enceinte opaque pour que la sonde radioactive fixée sur les fragments de DNA complémentaires impressionne le film.

On révèle le film : les taches noires (sur le négatif) correspondent aux emplacements où ont migré les fragments d'ADN complémentaires de la sonde.

→ La **technique de Southern possède de nombreuses applications** :

- Etablissement de cartographie de restriction ;
- Mise en évidence de familles multigénique, de pseudogènes (cf. séquence commune) ;
- Détection de polymorphisme de restriction : une séquence de reconnaissance d'une enzyme de restriction peut être présente chez les uns et absente chez les autres suite à une mutation ; dans ce cas, la taille des fragments de restriction diffèrent à ce site, on parle de polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP pour *restriction fragments length polymorphism* ;

- Détection de répétition, de délétion, d'inversions, de recombinaison de gènes.

Remarque : la méthode du Northern blot

→ Le principe est le même que pour le Southern Blot mais ici **ce sont les ARN qui sont étudiés**.
Cette méthode est peu employée actuellement.

→ Le **nom de Northern blot provient d'un jeu de mot** sur le terme Southern et non d'un docteur Northern.

→ **Les étapes :**

- Avec les ARN **on n'a plus besoin de digérer par les enzymes de restriction**.
- Les ARN totaux ou les ARN poly(A)⁺ sont séparés selon leur taille par migration dans un **gel d'agarose contenant un agent dénaturant (formamide) de manière à détruire d'éventuelles structures secondaires de l'ARN**.
- Les étapes de transfert et d'hybridation sont tout à fait similaires à celles utilisées pour l'ADN.

→ **La visualisation d'un ARN par une sonde permet :**

- d'apprécier sa distribution dans les tissus,
- d'étudier son abondance relative,
- de déterminer sa taille,
- de détecter les intermédiaires de maturation et les différentes formes d'épissage de l'ARN.

NB : On a reproduit ce jeu de mot pour **une technique d'analyse des protéines** similaire avec le terme **Western blot** : séparation des protéines par électrophorèse sur gel, transfert sur membrane et détection à l'aide d'anticorps marqués.

4.6.2. Les puces à ADN

→ Les puces à ADN sont aussi appelées **biopuces, DNA chips, DNA microarrays**.

→ Les puces à ADN servent à **rechercher des séquences nucléotidiques**.

→ Le **principe des puces à ADN repose sur le concept classique de l'hybridation moléculaire spécifique**.

Les puces à ADN portent, **greffées sur leur surface**, des **oligonucléotides de séquence connue** (fragments courts d'ADN simple brin) **susceptibles de s'apparier** à des brins complémentaires d'**ADN présents dans les échantillons biologiques à analyser**.

NB : *Ne pas utiliser le terme de sonde ici car de façon générale une sonde = séquence nucléotidique connue marquée.*

→ Technologie : *Voir planche*

- La puce est constituée d'un support miniaturisé de quelques cm² de surface sur lequel sont greffées plusieurs dizaine de milliers d'oligonucléotides de séquence connue. Les deux supports les plus utilisés actuellement sont la membrane de nylon et la plaque de verre.
- Pour fabriquer une puce à ADN, un des procédés courants consiste à déposer sur un support solide à l'aide d'une micropipette robotisée des milliers de fragments d'ADN. Chaque point de la puce représente un fragment d'ADN à la séquence précise.
- Lorsque le fragment d'ADN cible de l'échantillon à tester reconnaît sa séquence complémentaire d'ADN sur la puce, les deux fragments s'apparient pour reconstituer la double hélice d'ADN. C'est le phénomène d'hybridation.
- Les fragments d'ADN cibles sont marqués au moyen de traceurs fluorescents ou radioactifs (utilisation de deux isotopes ³H et ³²P). Le signal de chaque spot est enregistré grâce à un compteur pour la détection de la radioactivité ou un scanner pour la détection de la fluorescence.

→ **Les applications futures des puces à ADN sont nombreuses :**

- analyse du génotype = travail sur ADN directement ;
- analyse du transcriptome (*voir planche*) = analyse du phénotype (c'est-à-dire ce qui s'exprime) = travail sur ARNm purifiés convertis ensuite en ADNc ;
- diagnostic des facteurs de risque dans un très grand nombre de pathologies (cardiovasculaires, cancers, vieillissement) ;
- utilisation en pharmacie pour la mise au point de nouveaux médicaments ;
- détection de la contamination par des microorganismes et des organismes génétiquement modifiés dans l'agro-alimentaire.

Les puces à ADN intéressent un large marché, estimé à 2 milliards d'euros pour 2005.

4.6.3. Le Dot Blot

« *Dot* » signifie tache en anglais.

C'est une technique d'une grande simplicité, le dot blot est utilisé pour l'étude de petits fragments d'ADN ou des ARN.

Un échantillon est déposé sur un filtre en nylon. Contrairement au Southern blot, il n'y a pas d'étape préalable de digestion par des enzymes de restriction ni d'électrophorèse. Comme pour la technique de Southern, dénaturation, hybridation, lavage et autoradiogramme sont ensuite effectués. Dans le dot blot on utilise une sonde (oligonucléotide de séquence connue marqué par exemple avec des radioisotopes). Ainsi, cette technique permet de savoir si, dans le mélange des acides nucléiques testés, il existe une ou plusieurs séquences complémentaires de celle de la sonde.