

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de RELIZANE
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences Biologiques



Polycopié de cours

Destiné aux étudiants de Master1 Microbiologie et Contrôle de qualité.

Intitulé :

Bases des outils moléculaires.

Élaboré par :

Dr. DJELILATE Mohammed.

Année universitaire : 2023/2024

Avant propos

Les méthodes et les techniques de biologie moléculaire développées durant ces dernières décennies, pour séquencer, recombiner, transférer et analyser les produits de l'expression du matériel génétique des diverses espèces vivantes ont donné lieu à une application sous le nom de « Bases des outils moléculaires ».

Les notes de cours ont pour fonction de transmettre des connaissances, de proposer une démarche d'apprentissage, de suggérer une méthodologie, de susciter la participation active des étudiants et de guider l'apprentissage.

Ce polycopié est un support de cours de la matière de Biologie Moléculaire et Génie Génétique. Il est destiné comme support pédagogique aux étudiants de Master 1, semestre 1, spécialité " Microbiologie et contrôle de qualité ", année universitaire 2023-2024 suivant le canevas ministériel en complément des notions générales de Génétique Moléculaire déjà acquises par les étudiants en deuxième année de Licence en Biologie du système LMD. La matière de Biologie Moléculaire et Génie Génétique fournira, à travers des exemples concrets, un aperçu des développements des techniques de Biologie Moléculaire et de ses applications dans les sciences de la vie. L'objectif de ce polycopié de cours est d'initier les étudiants au langage et aux concepts de ce domaine. A l'issue de cette matière, les étudiants auront une connaissance des différentes méthodologies existantes sur lesquelles elles sont fondées. Ils seront capables de choisir et mettre en œuvre ces méthodologies en fonction des informations dont ils disposent (données de génétiques, type de matériel biologique ; animal, végétal, micro-organisme, ...). Cet enseignement permettra aux étudiants de faire le lien entre les différents enseignements de biologie et leurs applications en biotechnologie et recherche fondamentale et appliquée.

Résumé

Le présent polycopié est le fruit des années d'enseignement, Il est destiné à supporter l'apprentissage des outils de la biologie moléculaire pour les étudiants de master en Microbiologie et contrôle de qualité. Il pourrait même aider les étudiants en d'autres spécialités de Biologie.

Envisager de façon cohérente les multiples possibilités d'usage d'un même enseignement amène à réfléchir et conceptualiser une approche qui permet de constituer des ressources pédagogiques pouvant être automatiquement mises en forme pour les supports visés : que ce soit un polycopié rédigé qui sera imprimé ou visualisé dynamiquement sur une plateforme. Le but de ce polycopié est l'élaboration conceptuelle d'un cours de Biologie Moléculaire et Génie Génétique. Ce polycopié est divisé en trois parties la première partie présentant (chapitre 1 et 2) : les principes élémentaires et fondamentaux de la Biologie Moléculaire, les enzymes de restrictions et leurs utilisations comme l'extraction et la purification d'ADN. La deuxième partie (chapitre 3 et 4) : traite les principales méthodes expérimentales d'étude on expose les sondes, l'hybridation. La troisième partie (chapitre 5 et 6) décrit les vecteurs du clonage et leurs caractéristiques et la procédure de l'amplification in vitro de l'ADN (Amplification en Chaîne par Polymérase ou PCR). Le polycopié se termine par des références bibliographiques.

Mots clés : Acides nucléiques - Biologie Moléculaire – PCR- Enzyme de restrictions.

Abréviations

ADN	Acide Désoxyribo Nucléique Complémentaire
ADNc	Acide Désoxyribo Nucléique
ADNg	Acide DésoxyriboNucléique génomique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomique
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
BET	Bromure d'ETHidium
dNTP	DésoxyNucléotides TriPhosphates
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
Kb	Kilobase
M	Molaire
ml	Millitre
mn	Minute
pb	Paire de bases
pH	Potentiel Hydrogène
PCR	Polymerase Chain Reaction"
RFLP	Restriction Fragments Length Polymorphism
SNP	Simple Nucleotide Polymorphism
Taq	Termus aquaticus
%	Pourcentage

Avant-propos
Résumé
Abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des matières

	Page
<hr/>	
Chapitre 1 : Les enzymes de restrictions.	
<hr/>	
1. Enzymes utilisées en biologie moléculaire :	1
1.1. Le phénomène de restriction	1
1.2. Origine des enzymes de restriction	2
1.3. Nomenclature des enzymes de restriction	2
1.4. Les classes d'enzymes de restriction	3
1.5. Méthylation des sites de restriction et inactivation des enzymes de restriction	3
1.6. Utilisations des enzymes de restriction	4
1.6.1. Notion d'isoschizomères	4
1.6.2. Notion des Enzymes compatibles	5
1.6.3. La rétrotranscriptase ou transcriptase réverse	5
2. Les autres enzymes d'usage courant en biologie moléculaires génie génétique :	5
2.1. Les polymérases :	5
2.1.2. Les enzymes recopiant un ADN en ADN	5
2.1.3. La Taq polymérase :	6
2.1.4. Les enzymes recopiant un ARN en un ADN	6
2.1.5. Les enzymes recopiant un ADN en un ARN	7
2.2. Les ligases	7
2.3. Les nucléases	8
2.2.1. La DNase	8
2.2.2. La nucléase S1	8
2.4. Les enzymes enlevant ou ajoutant des groupes phosphates	8
2.4.1. Enzymes enlevant des groupes phosphates	8
<hr/>	
Chapitre 2 : Extraction et purification d'ADN chromosomique et d'ADN plasmidique.	
<hr/>	
Introduction	9
I. Méthodes d'extraction et de purification d'ADN chromosomique	9
1.1. Extraction et purification de l'ADN génomique chez les eucaryotes	10
1.1.1. À partir d'un prélèvement sanguin humain (Méthode sans phénol/chloroforme)	10
1.1.2. A partir d'extraits végétaux	11
1.1.2.1. Lyse de la membrane cellulaire	11
1.1.2.2. L'extraction	13
1.1.2.3. Précipitation	14
1.2. Extraction et purification de l'ADN génomique chez les procaryotes	14
1.2.1. Lyse cellulaire et dénaturation des protéines	14
1.2.2. Extraction au phénol	14
1.2.3. Concentration de l'ADN par précipitation à l'éthanol	15
2. Méthodes d'extraction et de purification d'ADN plasmidique	15
2.1. Les plasmides	15
2.2. Purification par lyse alcaline	15
2.3. Purification par Gradient de chlorure de césium	16

Chapitre 3 : Les Sondes.

1. Les sondes nucléotidiques	17
1.1. Définition	17
1.2. Caractéristique générales	17
1.3. Obtention d'une sonde.	17
2. Les agents de marquages	17
2.1. Les isotopes radioactifs	17
2.2. Marquage non radioactif	18
3. Quelques stratégies de marquage :	20
3.1. La « Nick translation » ou déplacement de cassure	20
3.2. La « Random printing » ou Marquage de l'ADN à l'aide d'amorces aléatoires	21
3.3. Le marquage des sondes synthétiques (Oligo-nucléotides de synthèse)	21
3.4. Les sondes ARN (ribosondes)	21

Chapitre 4 : Hybridation moléculaire

1. Différentes techniques d'hybridation	23
1.1. L'hybridation moléculaire avec la sonde	23
1.2. Southern blotting	24
1.3. Northern blotting	26
1.4. Dot Blot	27
1.5. Hybridation in situ (HIS)	27
1.6. Hybridation sur colonies	28
1.7. Hybridation in situ en fluorescence (FISH)	28

Chapitre 5 : Clonage.

Introduction	30
1. Sources et préparation de l'ADN à cloner	30
1.1. Outils cellulaires	30
1.2. Outils moléculaires	30
1.2.1. ADN génomique	31
1.2.2. ADN complémentaire	31
1.2.3. ADN synthétique	32
2. Banque d'ADN.	32
2.1 Banque d'ADN génomique	32
2.2 Banque ADN complémentaire (ADNc)	34
3. Les vecteurs de clonage : plasmides ; cosmides ; BAC ; PAC ; YAC	36
3.1. Généralités	36
3.2. Les plasmides	36
3.2.1. Propriétés générales des plasmides	37
3.2.2. Préparation des plasmides	37
3.2.3. Sélection des bactéries transformées par des plasmides	38
3.2.4. Avantages et désavantages des plasmides	39
3.3. Les phages :	39
3.3.1. Propriétés générales des phages	39
3.4. Les cosmides :	41
3.4.1. Propriétés générales des cosmides	41
3.5. Autres types de vecteurs	41
3.5.1. Les BAC.	41
3.5.2. Les PAC.	41
3.5.3. Les YAC.	41
4. Les vecteurs d'expression et les cellules hôtes	42
5. Criblage de la banque d'ADN (Détection des recombinants)	44
6. Amplification et sélection d'acides nucléiques particuliers (PCR)	45
6.1. Réalisation pratique	46

6.2. Utilisations des produits PCR	47
6.3. Séquençage	49

Chapitre 6 : Transfert de l'ADN dans les cellules

1. Transfert direct	51
1.1 Biolistique	51
1.2 Micro-injection	51
2. Transformation/transfection	51
2.1 Méthodes chimiques	51
2.2 Co-précipitation de l'ADN et du phosphate de calcium	52
2.3 DAEA-dextran (Di-Ethyl-Amino Ethyl-dextran)	52
2.4 Polycation-DMSO (cellules eucaryotes)	52
2.5 Fusion des protoplastes	52
2.6 Lipofection	52
2.7 Peptides	53
2.8 Electroporation	53
2.9 Transduction virale (encapsidation in vitro)	53
Références Bibliographiques	54

Liste des figures

N°	Titres des figures	Page
1	Destruction du génome viral par les enzymes de restriction bactériennes.	1
2	Actions d'une enzyme de restriction - coupure franche	3
3	Actions d'une enzyme de restriction - coupure cohésive	3
4	Action de T4 ADN ligase	7
5	Action de phosphatase	8
6	Représentation simplifiée des membranes cellulaires	12
7	Solubilisation des lipides.	12
8	Rupture de la membrane cellulaire et extraction de l'ADN génomique	13
9	Purification de plasmide sur gradient de Chlorure de Césium	16
10	Détection indirecte de groupements marqués dans les acides nucléiques.	19
11	Marquage de l'ADN par nick translation (déplacement de cassure).	20
12	Marquage de l'ADN par amorce aléatoire.	21
13	Les sondes ARN sont habituellement produites par transcription d'inserts ADN clonés grâce à une ARN polymérase de phage.	22
14	Notion d'hybridation	23
15	Les étapes d'hybridation.	24
16	Technique de southern blot	25
17	Technique de Northern blot	26
18	Technique d'hybridation in situ en fluorescence	29
19	Synthèse d'ADNc double brin à partir d'ARNm	31
20	Principe de construction d'une banque plasmidique d'ADN génomique total	33
21	Principe du Clonage de l'ADNc.	35
22	Insertion d'une séquence d'ADN bicaténaire dans un plasmide.	38
23	Sélection des bactéries transformées par des plasmides.	39
24	Chromosome artificiel de levure. (YAC).	42
25	Criblage par hybridation de l'ADN des clones transformés avec une sonde spécifique.	45
26	Les étapes de la technique de PCR.	47
27	Technique de séquençage.	50
28	Absorption d'ADN plasmidique par une cellule bactérienne compétente.	51

Liste des tableaux

N°	Titres des figures	Page
1	Fluorophores pour le marquage des acides nucléiques	18
2	Différence entre une banque d'ADNg /ADNc	36

Chapitre 1 : Les enzymes de restrictions.

1. Enzymes utilisées en biologie moléculaire :

1.1. Le phénomène de restriction :

Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des séquences dites palindromiques. Les séquences palindromiques sont des séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5' à 3' (gauche-droite) pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens droite-gauche pour le second brin (sens 5' à 3'). Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4, 5 ou 6 paires de bases. Il faut remarquer que dans les ADN, on rencontre statistiquement des séquences reconnues par des enzymes de restriction. Ainsi, la séquence GATC reconnue par l'enzyme *Mbo I* est présente avec une fréquence statistique de 1 / 256 paires de bases (1/ 44). En effet, la fréquence de coupure d'un ADN par une enzyme de restriction donnée peut être approchée statistiquement en considérant le nombre de nucléotides de la séquence spécifique reconnue par l'enzyme. Ainsi, par exemple, dans la séquence de six nucléotides : GGATCC reconnue par l'enzyme Bam HI, on aura donc une fréquence de coupure statistique de 1 / 46, soit 1 coupure tous les 4096 nucléotides.

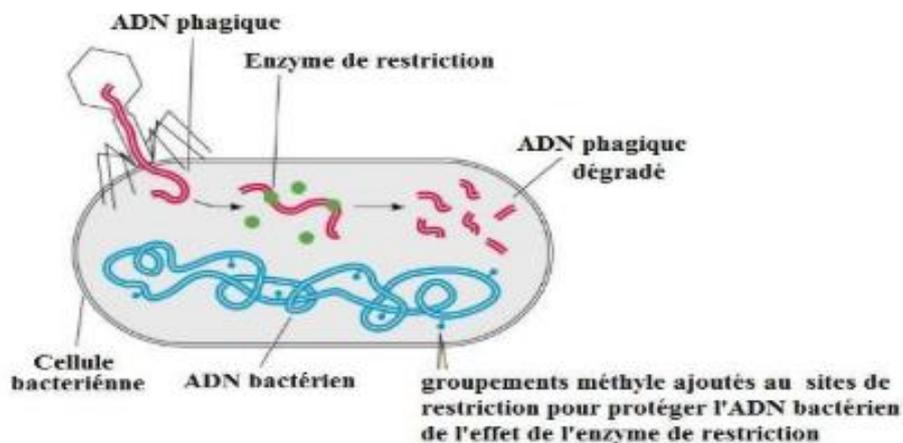


Figure 01 : Destruction du génome viral par les enzymes de restriction bactériennes.

(Lionnet et Croquette, 2005).

1.2. Origine des enzymes de restriction :

Les enzymes de restriction sont extraites de micro-organismes, le plus souvent des bactéries. Les bactéries peuvent être parasitées par des virus à ADN. Les bactéries fabriquent des enzymes de restriction qui sont capables de cliver les ADN étrangers. Pour éviter une autodestruction de leur propre ADN, elles se protègent contre leurs propres enzymes de restriction par une modification des sites de restriction correspondants.

1.3. Nomenclature des enzymes de restriction :

Les enzymes de restriction présentent une nomenclature bien précise. Leur nom comporte plusieurs lettres (3 ou 4). La première lettre de dénomination de l'enzyme est écrite en majuscule, elle correspond au genre de la bactérie d'où a été extraite l'enzyme.

La seconde lettre et la troisième lettre (en minuscules) correspondent à l'espèce de la bactérie d'où l'enzyme est extraite. On peut avoir une quatrième lettre écrite en majuscule correspondant à la souche bactérienne. Enfin pour terminer, un chiffre romain indique l'ordre de caractérisation de ces enzymes. Exemples :

Eco RI Extraite de *Escherichia coli* RYB site reconnu : G / AATTC

Sma I Extraite de *Serratiamarcescens* site reconnu : CCC / GGG

Pst I Extraite de *Providenciastuartii* site reconnu : CTGCA / G

Ce sont des endonucléases qui sont produites par les bactéries pour se protéger des molécules d'ADN de bactéries parasitées par des phages. Une nucléase catalyse l'hydrolyse des liaisons phosphodiester. Une endonucléase coupe au milieu alors qu'une exo nucléase coupe à partir du côté.

Les enzymes de restriction endonucléase coupe au palindrome (les 2 brins complémentaires ont une séquence 5'P →3'OH identiques). On peut obtenir une extrémité franche (il n'y a pas de cohésion avec les 2 morceaux, exemple : l'enzyme *Hae III* isolée de *Haemophilus aegyptius*) (Figure 1), ou une extrémité cohésive (possibilité de s'hybrider à nouveau et de reformer le site, exemple : L'enzyme de restriction *EcoRI* isolée d'*Escherichia coli* et l'enzyme *PstI* isolée de la bactérie *Providencia stuarti*) (Figure 2).

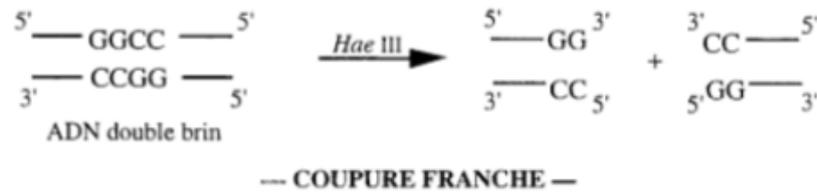


Figure 2 : Actions d'une enzyme de restriction - coupure franche (Denis *et al.*, 2018).

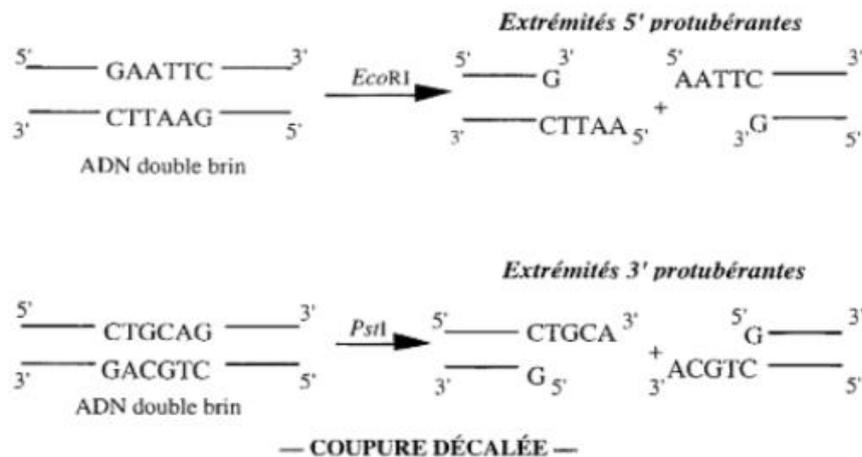


Figure 3 : Actions d'une enzyme de restriction - coupure cohésive (Denis *et al.*, 2018).

1.4. Les classes d'enzymes de restriction :

La plupart des enzymes de restriction utilisées au laboratoire présentent un site de reconnaissance (souvent palindromique) et un site de coupure identique ou proche du site de reconnaissance, ce sont des enzymes de type II. Certaines bactéries possèdent d'autres types d'enzymes de restriction.

Les enzymes de type I reconnaissent des séquences sur l'ADN sans aucune symétrie. Ces enzymes coupent non pas au niveau de la séquence de reconnaissance mais 1000 à 5000 paires de bases plus loin. Les enzymes de type III présentent également un site de reconnaissance mais coupent une vingtaine de nucléotides plus loin.

1.5. Méthylation des sites de restriction et inactivation des enzymes de restriction :

L'ADN bactérien présente des sites de restriction susceptibles d'être repérés par les enzymes de restriction que possède la bactérie. Pour éviter une auto-destruction, les enzymes de

modification de l'ADN bactérien interviennent. Ces enzymes de modification sont des méthylases bactériennes (ou enzymes de méthylation). La méthylation de la cytosine (sur le carbone 5) ou de l'adénine (sur l'azote 6) appartenant à des sites de restriction aboutit à une inactivation de l'enzyme de restriction correspondante. Cette méthylation peut se réaliser sur une base ou sur plusieurs bases appartenant au site de restriction. Les méthylases bactériennes sont très spécifiques.

Les méthylations dans le génome des eucaryotes concernent les cytosines impliquées dans les doublets dinucléotidiques CG. La recherche de ces doublets et de la présence ou non d'une méthylation sur les cytosines est réalisée à l'aide de deux enzymes de restriction, une enzyme insensible à la méthylation des cytosines et une autre enzyme sensible à la méthylation des cytosines.

1.6. Utilisations des enzymes de restriction :

Les utilisations des enzymes de restriction sont très nombreuses en biologie moléculaire. Par exemple, elles permettent de fractionner l'ADN en multiples fragments susceptibles d'être séparés par les techniques d'électrophorèse. Les enzymes de restriction peuvent être utilisées pour préparer un fragment d'ADN d'un gène donné (insert) à être inséré dans un vecteur comme un plasmide. Les enzymes de restriction sont utilisées couramment pour rechercher des mutations dans le génome.

Les enzymes de restriction sont utilisées pour rechercher dans l'ADN des cellules eucaryotes les méthylations de bases. Ces méthylations ont une signification complètement différente des méthylations de bases observées chez les procaryotes. Elles sont en relation directe avec des modifications de l'expression des gènes des eucaryotes. La méthylation provoque le verrouillage de l'expression de tel ou tel gène dans un tissu.

1.6.1. Notion d'isoschizomères :

Des enzymes de restriction différentes peuvent reconnaître des mêmes sites spécifiques, on les appelle isoschizomères. Les isoschizomères fournissent souvent après clivage enzymatique des fragments dont les extrémités sont différentes.

Exemple : Soit la séquence suivante : GGTACC, cette séquence est coupée par l'enzyme Kpn I et l'enzyme Acc65 I :

Kpn I: 5'-G-G-T-A-C/C-3'
3'-C/ C-A-T-G-G-5'
Acc65 I: 5'-G/G-T-A-C-C-3'
3'-C-C-A-T-G/G-5'

Ces enzymes sont des isoschizomères, elles reconnaissent en effet la même séquence nucléotidique GGTACC. On voit tout de suite que les extrémités des fragments obtenus diffèrent.

1.6.2. Notion des Enzymes compatibles :

Les enzymes compatibles, ne reconnaissent pas le même site de restriction, mais ils génèrent des fragments aux extrémités « cohésives » complémentaires, qui peuvent donc être ligaturées.

1.6.3. La rétrotranscriptase ou transcriptase réverse :

Les transcriptases réverses sont des DNA polymérases qui peuvent synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc ou cDNA) en prenant un ARN comme matrice (C'est une ADN polymérase ARN –dépendant), pour former un hybride ADN : ARN. Elles catalysent donc la réaction inverse de la transcription, d'où le nom de transcriptases réverses. La réaction catalysée par les transcriptases inverses se déroule selon un mécanisme analogue à celui de l'ADN polymérase classique.

2. Les autres enzymes d'usage courant en biologie moléculaires génie génétique :

2.1. Les polymérases :

Les enzymes recopiant aussi bien une chaîne d'ADN ou d'ARN ont les propriétés générales suivantes :

- Elles synthétisent le nouveau brin dans le sens 5' à 3'.
- Cette synthèse s'effectue de manière complémentaire et antiparallèle.
- Elles nécessitent la présence de nucléosides triphosphates (NTPs) ou de désoxynucléosides triphosphates (dNTPs).

2.1.2. Les enzymes recopiant un ADN en ADN : Ces enzymes sont des ADN polymérases ADN dépendantes. Elles ne sont pas capables de synthétiser le brin nouveau d'ADN sans la présence d'une amorce d'acide nucléique. Toutes les ADN polymérases possèdent les caractéristiques suivantes :

- Elles ont besoin d'une amorce avec une extrémité 3'-OH libre.
- La chaîne nouvelle d'ADN est synthétisée dans le sens 5' à 3'.
- La chaîne nouvelle est complémentaire de la chaîne matrice d'ADN et antiparallèle.

Exemple1 *L'ADN polymérase I (extraite de E. Coli) et le fragment de Klenow.*

Comme exemple-type d'ADN polymérase, nous citerons l'ADN polymérase I qui est extraite d'E.coli. Cette enzyme possède des propriétés polymérasiques, mais aussi des propriétés exonucléasiques. Il est important de préciser que les exonucléases peuvent couper les nucléotides un par un à partir d'une chaîne polynucléotidique avec une spécificité soit de l'extrémité 5' (coupure 5' à 3'), soit de l'extrémité 3' (coupure 3' à 5'). L'ADN polymérase I possède les deux activités exonucléasiques : 5' à 3' et 3' à 5'. Cette enzyme est constituée par une seule chaîne polypeptidique.

Au laboratoire, on utilise souvent une enzyme préparée à partir de l'ADN polymérase I qui est appelée fragment de KLENOW. Cette enzyme ne possède plus d'activité exonucléasique 5' à 3', il reste les propriétés polymérasiques et les propriétés exonucléasiques 3' à 5'. L'activité 3' à 5' permet à l'enzyme au cours d'une synthèse d'un fragment d'ADN de contrôler si l'appariement de la base qui vient d'être ajoutée est conforme aux règles de complémentarité. Cette remarquable activité exonucléasique 3' à 5' est encore appelée la fonction d'édition de l'enzyme.

Pour plus d'informations sur la DNA polymérase et sa mise en évidence voir le chapitre synthèse in vitro de ce cours.

Exemple2 *La Taq polymérase*

2.1.3. La Taq polymérase : est une ADN polymérase extraite de bactéries présentes dans les sources chaudes. Elle permet de travailler à des températures plus élevées que les températures usuelles (ambiante ou 37°C). Elle est très utilisée dans les réactions d'amplification génique et également dans les réactions de séquençage de l'ADN. En principe, elle est dépourvue de l'activité exonucléasique 3' à 5'.

2.1.4. Les enzymes recopiant un ARN en un ADN :

Exemple1 *la rétrotranscriptase ou transcriptase inverse :*

Cette enzyme est surtout présente dans les rétrovirus (virus à ARN). Elle permet de fabriquer à partir d'un ARN messager (mARN) un ADNc (ou séquence d'ADN complémentaire d'un mARN).

Elle possède les propriétés suivantes :

- C'est une ADN polymérase qui synthétise le nouveau fragment dans le sens 5' à 3'.
- Elle est ARN-dépendante.
- Elle est dépourvue d'activité exonucléasique 3' à 5', donc de fonction d'édition. Elle peut donc insérer des bases par erreur.
- Elle a une activité RNase.

2.1.5. Les enzymes recopiant un ADN en un ARN :

Les ARN polymérases réalisent des transcriptions de l'un des deux brins d'ADN en un brin d'ARN. Elles sont extraites des bactéries. Ces ARN polymérases possèdent les propriétés suivantes :

- Elles synthétisent le brin nouveau dans le sens 5' à 3'.
- Elles n'ont pas besoin d'amorce pour commencer la synthèse (à la différence des ADN polymérases).
- Elles nécessitent des ribonucléosides triphosphates (ou NTPs) et également (comme les autres polymérases) des ions Mg^{2+} .
- Elles sont dénuées d'activité d'édition.
- Enfin, dans des conditions normales de transcription, les ARN polymérases ne peuvent démarrer la transcription que si l'ADN à transcrire possède le promoteur spécifique correspondant.

2.2. Les ligases :

Les ligases sont capables de lier par une liaison ester un fragment avec un groupement phosphate en 5' et un groupement OH en 3' et ceci en présence d'ATP. Elles peuvent effectuer des ligatures sur des fragments d'ADN avec bouts francs ou des bouts collants (ou extrémités cohésives). Elles sont extraites de bactéries. Il existe ADN et ARN ligases.

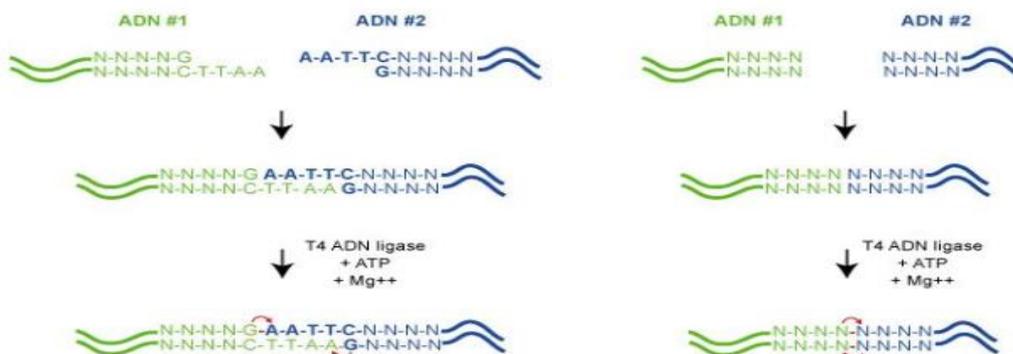


Figure 4 : Action de T4 ADN ligase (De Donald et Judith, 2011).

2.3. Les nucléases :

2.2.1. La DNase :

La DNase utilisée au laboratoire est extraite du pancréas de bovin. Il s'agit d'une endonucléase qui coupe l'ADN double brin (mais aussi l'ADN simple brin). Elle conduit à des coupures ou « nicks » tout à fait au hasard, sans reconnaissance d'un site spécifique (ce qui la distingue des enzymes de restriction). On obtient des fragments de tailles variées (ou oligonucléotides) qui possèdent en leur extrémité 5' un groupement phosphate. Cette enzyme est sensible à des ions bivalents (Mg^{2+} et Mn^{2+}).

2.2.2. La nucléase S1 :

Cette enzyme extraite d'un champignon, n'attaque que l'ADN simple brin. Elle n'attaque pas en principe les ADN doubles brins et les hybrides ADN-ARN.

2.4. Les enzymes enlevant ou ajoutant des groupes phosphates :

2.4.1. Enzymes enlevant des groupes phosphates :

Ces enzymes sont appelées phosphatases. Les phosphatases alcalines sont actives à pH alcalin. Elles permettent d'enlever le groupement phosphate situé en 5' d'une chaîne d'ADN. Elles sont extraites de bactéries ou d'origine animale (intestins). Elles sont utilisées pour préparer de l'ADN recombinant.

Enzymes ajoutant des groupements phosphates Les kinases permettent de fixer un groupement phosphate en présence d'ATP. Dans cette molécule d'ATP, le phosphate fixé est celui situé en position gamma (position la plus externe) de la molécule d'ATP. Le groupement phosphate est fixé à l'extrémité 5' d'un ADN préalablement déphosphorylé. Ces kinases sont extraites de bactéries.

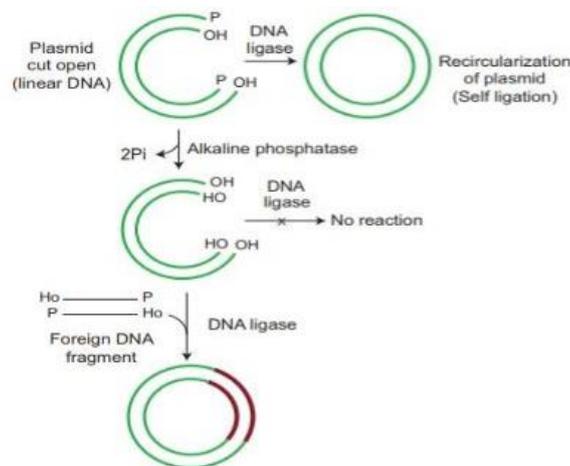


Figure 5 : Action de phosphatase (De Donald et Judith, 2011).

Chapitre 2 : Extraction et purification d'ADN chromosomique et d'ADN plasmidique.

Introduction :

L'extraction et la purification des acides nucléiques et plus précisément d'ADN sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN recombinant. Afin d'obtenir des molécules d'ADN hautement purifiés exempts de tout contaminant visibles, des méthodes d'extraction adéquates devraient être appliquées. Vu qu'il existe une grande diversité de méthodes d'extraction et de purification des ADN, le choix de la technique la plus adéquate repose généralement sur les critères suivants :

- L'organisme source,
- Le matériel de départ (tissu, feuille, graine, matériel transformé, etc.),
- Les résultats escomptés (rendement, pureté, temps de purification requis, etc.),
- L'application en aval (PCR, clonage, étiquetage, transfert d'ADN, RT-PCR, synthèse d'ADNc, etc.).

1. Méthodes d'extraction et de purification d'ADN chromosomique :

L'extraction d'ADN chromosomique d'un matériel biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'ADN chromosomique des débris cellulaires. La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ complexe (par exemple, le tissu), mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible.

Généralement, il existe différents protocoles d'extraction l'ADN chromosomique qui suit approximativement le même schéma de principe :

***Lyse cellulaire ou rupture de la membrane :** Les procédures de lyse courantes sont accomplies par des méthodes physiques (ex. : broyage ou lyse hypotonique), des méthodes chimique (ex.: lyse détergente, agents chaotropiques, réduction des thiols) et la digestion enzymatique (ex.: protéinase K).

La rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires peuvent être combinées. À titre d'exemple, une solution simple peut contenir des détergents pour solubiliser les membranes cellulaires et des sels chaotropiques puissants pour inactiver les enzymes intracellulaires. Après la lyse cellulaire et l'inactivation de la nucléase, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtrage ou par précipitation.

***Élimination des lipides :** L'élimination ou la séparation des lipides membranaires et des débris cellulaires se fait généralement à l'aide de détergents comme le sodium dodecyl sulfate (SDS) et par centrifugation.

***Élimination des protéines de l'extrait cellulaire :** La dénaturation des protéines est effectuée à l'aide d'une protéase telle que la pronase ou la protéinase K. Après quoi, les protéines dénaturées sont séparées de l'extrait cellulaire.

***Élimination de l'ARN :** l'ARN est éliminé par addition de RNase qui le dégrade rapidement en ribonucléotides.

***Précipitation/agrégation/élution de l'ADN :** la molécule d'ADN est précipitée par l'ajout de l'alcool éthylique absolu permettant la formation d'une pelote blanchâtre.

1.1. Extraction et purification de l'ADN génomique chez les eucaryotes :

Il existe plusieurs méthodes d'extraction et de purification d'ADN génomiques chez les espèces eucaryote reposant sur le même principe, à la différence des sources considérées.

1.1.1. À partir d'un prélèvement sanguin humain (Méthode sans phénol/chloroforme) :

Le sang prélevé sur tube EDTA est traité le même jour ou conservé à -20°C jusqu'à utilisation. 4 mL de sang sont transférés dans un tube Falcon et additionné de 11 mL d'une solution Tris EDTA (TE) 10 mM à pH 8. Le tube Falcon est mis dans un bac de glace pendant 30 minutes, puis centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes. Le culot est remis en suspension dans la même solution de TE et recentrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes. Cette opération d'élimination de l'hémoglobine est répétée plusieurs fois jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le Buffy coat obtenue représente une mince couche grisâtre de leucocytes et plaquettes d'un volume d'environ 2 mL. L'ADN génomique est extrait à partir de ce Buffy coat par la technique de Miller (1988) selon le principe du salting out.

5 ml de tampon de lyse (TRIS/HCL 10Mm PH= 8, EDTA 1Mm, SDS 0,5%) sont additionnés à 30 μL de protéinase K à 20mg/ml au Buffy coat. Après incubation 24 heures à 37°C sous agitation, on ajoute 2 mL de NaCl 5 M. Le mélange est centrifugé 10 minutes à 4000 tours /min. Les protéines sont ainsi précipitées. Le surnageant est transverse délicatement dans un tube Falcon de 50 mL et additionné de deux volumes d'éthanol absolu à froid. Le tout est mélangé lentement par mouvement de rotation afin de précipiter la pelote d'ADN. L'ADN est récupéré à l'aide d'une pipette pasteur thermo soudée à son extrémité et rincé avec de l'éthanol à 70%.

Après un temps de séchage, l'ADN est solubilisé dans des tubes Eppendorfs contenant un volume de la solution du TE10/1 pH 8 sous agitation rotative à 37°C pendant 24 à 48h.

1.1.2. A partir d'extraits végétaux :

Parmi les procédés les plus utilisés, Méthode d'extraction et de purification au CTAB (cetyltriméthyl ammonium bromure). Etabli pour la première fois par Murray et Thompson en 1980, le protocole du test au cetyltriméthyl ammonium bromure (CTAB) a été publié ultérieurement, et plus précisément en 1987, par Wagner et ses collègues.

Cette méthode convient pour la suppression des polysaccharides et des composés polyphénoliques qui affectent la pureté de l'ADN et donc la qualité. Le principe de la méthode repose sur trois étapes lyse, extraction et précipitation.

Des cellules végétales peuvent être lysées en utilisant le détergent ionique cetyltriméthyl ammonium bromure (CTAB), qui forme un complexe insoluble avec les acides nucléiques dans un environnement à faible teneur en sels. Dans ces conditions, les polysaccharides, les composés phénoliques et les autres contaminants restent dans le liquide surnageant et peuvent être lavés. Le complexe d'ADN est solubilisé en élevant la concentration en sels et précipité avec de l'éthanol ou de l'isopropanol. Les principes des trois principales étapes, à savoir la lyse de la membrane cellulaire, l'extraction de l'ADN génomique et sa précipitation sont décrits ultérieurement.

1.1.2.1. Lyse de la membrane cellulaire : comme il a été mentionné précédemment, la première étape de l'extraction d'ADN est la rupture de la cellule et de la membrane nucléaire. À cette fin, l'échantillon homogénéisé est tout d'abord traité avec le tampon d'extraction contenant de l'EDTA, du Tris/HCl et du CTAB. Toutes les membranes biologiques ont une structure générale commune comprenant des molécules de lipide et de protéines maintenues ensemble par des interactions non covalentes.

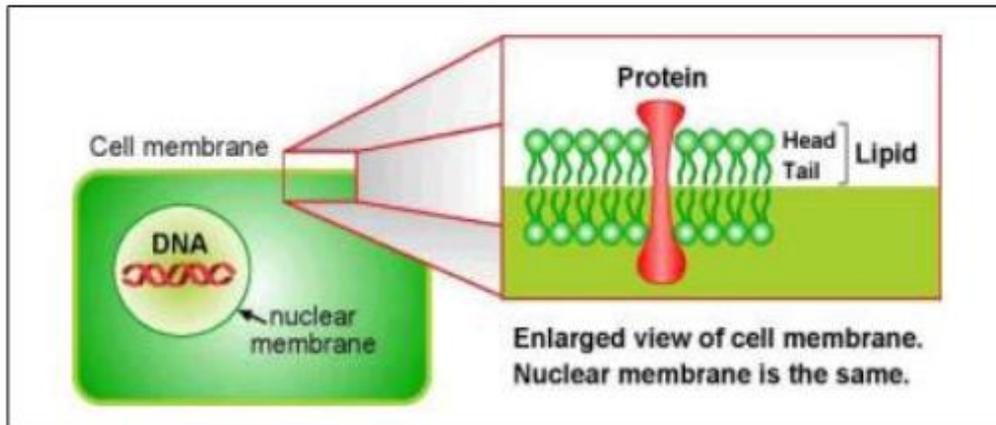


Figure 6 : Représentation simplifiée des membranes cellulaires.
(<http://gslc.genetics.utah.edu>).

Comme le montre la Figure 06, les molécules de lipides sont agencées sous forme de double couche continue dans laquelle les molécules de protéine sont « dissoutes ». Les extrémités des molécules de lipides se composent de « têtes » hydrophiles et de « queues » hydrophobes. Dans la méthode au CTAB, la lyse de la membrane est accomplie par le détergent (CTAB) contenu dans le tampon d'extraction. Comme la composition des lipides et celle du détergent sont semblables, le composant CTAB du tampon d'extraction a pour fonction de piéger les lipides qui constituent la cellule et la membrane nucléaire. Le mécanisme de solubilisation des lipides en utilisant un détergent est illustré dans la Figure 07.

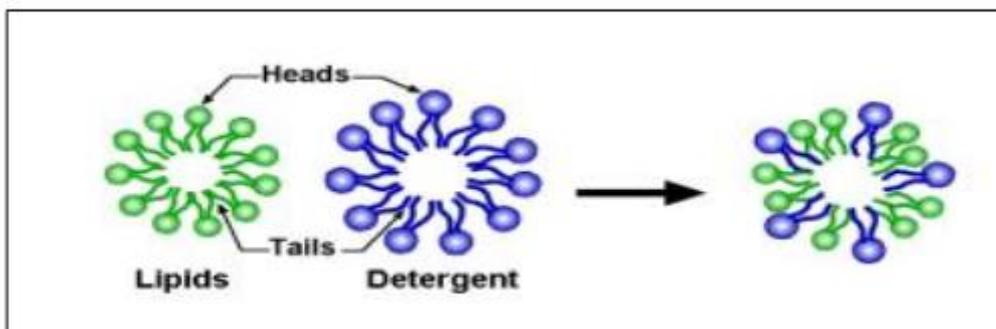


Figure 7 : Solubilisation des lipides.
(<http://gslc.genetics.utah.edu>).

La Figure 07 montre comment le détergent piège les lipides et les protéines, autorisant ainsi la libération de l'ADN génomique, lorsque la membrane cellulaire est exposée au tampon

d'extraction au CTAB. Dans une concentration salique (NaCl) spécifique, le détergent forme un complexe insoluble avec les acides nucléiques. L'EDTA est un composant de chélation qui lie le magnésium, entre autres métaux. Le magnésium est un cofacteur pour la DNase. En liant le Mg à l'EDTA, l'activité de la DNase présente est diminuée. La combinaison Tris/HCl donne à la solution une capacité d'atténuation du pH (un pH faible ou un pH élevé endommage l'ADN). Il est important de souligner qu'étant donné le risque de dégradation aisée des acides nucléiques à ce stade de la purification, le temps écoulé entre l'homogénéisation de l'échantillon et l'ajout de la solution tampon au CTAB devrait être limité. La purification de l'ADN est réalisée dès que la cellule et les membranes de l'organelle (comme celles qui entourent les mitochondries et les chloroplastes) sont séparées.

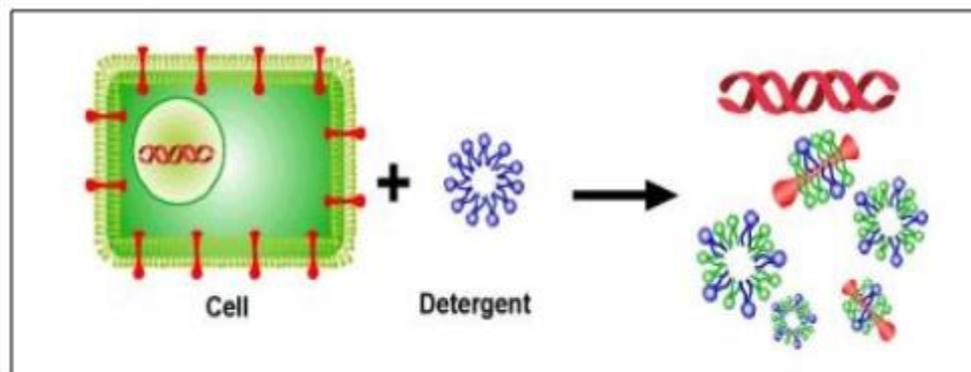


Figure 8 : Rupture de la membrane cellulaire et extraction de l'ADN génomique.
(<http://gslc.genetics.utah.edu>).

1.1.2.2. L'extraction :

Dans cette phase, les polysaccharides, les composés phénoliques, les protéines et les autres lysats cellulaires dissous dans la solution aqueuse sont séparés du complexe acide nucléique / CTAB. L'élimination des polysaccharides, ainsi que des composés phénoliques est particulièrement importante en raison de leur capacité à inhiber un grand nombre de réactions enzymatiques. Dans une concentration à faible teneur en sels (< 0,5 M NaCl), les contaminants du complexe d'acide nucléique ne précipitent pas et peuvent être enlevés par l'extraction hors de la solution aqueuse au moyen de chloroforme. Ce dernier dénature les protéines et facilite la séparation des phases aqueuses et organiques. Normalement, la phase aqueuse constitue la phase supérieure. Mais si la phase aqueuse est dense, en raison de sa concentration en sels (> 0,5 M), elle constituera la phase inférieure. L'acide nucléique aura, en outre, tendance à se dissoudre dans la phase organique si le pH de la solution aqueuse n'a pas été équilibré comme

il se doit à une valeur de pH comprise entre 7,8 et 8,0. Au besoin, l'extraction au chloroforme est répétée deux ou trois fois afin d'enlever complètement les impuretés de la couche aqueuse. Pour parvenir à la meilleure récupération possible de l'acide nucléique, une rétroextraction de la phase organique peut être réalisée à l'aide d'une solution aqueuse qui est ajoutée ensuite à l'extrait précédent. Une fois que le complexe d'acide nucléique a été purifié, la dernière étape de la procédure peut être accomplie. Il s'agit de la précipitation.

1.1.2.3. Précipitation :

À ce stade final, l'ADN génomique est libéré du détergent. À cette fin, la solution aqueuse est tout d'abord traitée à l'aide d'une solution de précipitation composée d'un mélange de CTAB et de NaCl à concentration élevée (> 0,8 M NaCl). Le sel est indispensable à la formation d'un précipité d'acide nucléique.

L'acétate de sodium peut être préféré au NaCl pour sa capacité de tamponnage. Dans ces conditions, le détergent, qui est plus soluble dans l'alcool que dans l'eau, peut être élué, tandis que l'acide nucléique (ADN) précipite. Le traitement successif par 70% d'éthanol permet une purification ou élution supplémentaire des sels résiduels (Somma, 2004 ; Henry, 2008).

1.2. Extraction et purification de l'ADN génomique chez les procaryotes :

L'objectif de la méthode est de purifier l'ADN génomique de source procaryote tel que *d'E. coli*. Les cellules sont d'abord concentrées après centrifugation puis lysées. On réalise ensuite une extraction au phénol ce qui permet de se débarrasser des protéines cellulaires. Les molécules d'ARN sont éliminées par des RNase. Pour concentrer l'ADN, la méthode utilisée est la précipitation à l'éthanol.

1.2.1. Lyse cellulaire et dénaturation des protéines :

Dans un tube à centrifuger en polypropylène, 3mL de culture d'E.coli sont introduit puis Centrifugé 5minutes à 150 g, le culot est dissolu dans 2,5 mL de tampon S.E (saline-EDTA, pH=8). Une solution de lysozyme de 0,15 mL est ajouté et incubé 30 minutes à 37°C puis ajouter 0,2mL de SDS. Le mélange est incubé 10 minutes à 60°C, puis refroidi dans la glace jusqu'à température ambiante. 0,60mL de NaClO₄ sont ajouté lentement et mélangé par agitation douce.

1.2.2. Extraction au phénol : Un volume de 3,5mL de phénol saturé est mélangé par retournements successifs pendant 5 minutes de manière à maintenir une émulsion. Le tube est ensuite centrifugé à 16000 x g pendant 5 min à température ambiante pour séparer la phase aqueuse de la phase phénolique. La phase aqueuse supérieure, qui contient l'ADN génomique

est récupérée dans un nouveau tube, puis traitée de la même façon avec un mélange phénol/chloroforme. Après ce dernier traitement la seconde solution aqueuse obtenue est additionnée avec 100µg de RNase par mL, puis le mélange est incubé 15 minutes à 37°C. Une autre extraction par le mélange phénol/chloroforme est nouvellement appliquée, la phase aqueuse récupérée est mélangée avec le même volume de chloroforme afin d'éliminer toute trace de phénol. Le tube est ensuite centrifugé à 16000 x g pendant 5 min à température ambiante pour séparer la phase aqueuse de la phase organique.

1.2.3. Concentration de l'ADN par précipitation à l'éthanol :

2,5 volumes d'éthanol à 95% et un volume V d'acétate de sodium à une concentration finale de 0,3 M sont ajoutés à un volume de la phase aqueuse, le mélange est incubé 30 minutes à - 20°C, puis centrifugé 15 minutes à 12000 g. Le culot obtenu est lavé par une solution d'éthanol à 70%. Centrifuger à nouveau 5 minutes à 12000 g et éliminer le surnageant, le culot est séché afin d'éliminer les traces d'éthanol. Le précipité est dissout dans 0,5mL de SSC (sodium saline citrate).

2. Méthodes d'extraction et de purification d'ADN plasmidique :

2.1. Les plasmides : Rappel

- Petites molécules d'ADN habituellement circulaire.
- Existent indépendamment des chromosomes de l'hôte.
- Présents chez nombreuses bactéries (quelques levures et mycètes)
- Réplication autonome (=réplicons) indépendamment des chromosomes
- Portent un nombre de gènes très réduit (≤ 30)
- A information génétique non-essentielle pour l'hôte
 - En nombre variable :
- Plasmide à copie unique (1 seul/cellule hôte)
- Plasmides à copies multiples (40 ou + /cellule hôte).

2.2. Purification par Lyse alcaline

C'est Parmi les techniques les plus courantes de la biologie moléculaire, consistant à une préparation sélective de l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien selon les étapes suivantes :

- Lyse des cellules par le détergent (SDS) en présence de soude (pH 13) donnant une Dénaturation de l'ADN total,
- Neutralisation rapide par acétate de potassium (pH 5,5) donnant une renaturation de l'ADN plasmidique et une précipitation de l'ADN Chromosomique,
- Concentration de l'ADN plasmidique par précipitation à l'alcool et récupération de l'ADN par centrifugation,
- Suspension de l'ADN plasmidique dans TE ou Eau pure et élimination des ARN par ribonucléases (hydrolyse sélective des ARN/ ADN intact).

2.3. Purification par Gradient de chlorure de césium

Les acides nucléiques sont séparés par ultracentrifugation isopycnique en chlorure de césium (CsCl). Ce sel peut atteindre une densité très élevée, de l'ordre de 1.9 g/mL à 7.5 mol/L. Cette possibilité d'atteindre des densités si élevées en solution aqueuse est son principal avantage.

Un gradient de densité stable est réalisé par ultracentrifugation du CsCl en présence d'un agent intercalant le Bromure d'éthidium ou BET reposant sur l'affinité du BET pour les différentes formes d'ADN. La densité moyenne de l'ADN chromosomique bactérien et d'un plasmide sont différents en présence de BET. Les molécules d'ADN se séparent en fonction de leur densité indépendamment de leur taille ou de leur masse : elles se stabilisent en cours de centrifugation au point où leur densité est égale à celle du milieu environnant. Cette technique, appelée centrifugation isopycnique (à l'équilibre de densité), est utilisée pour la purification en grande quantité les plasmides bactériens (Figures 09).

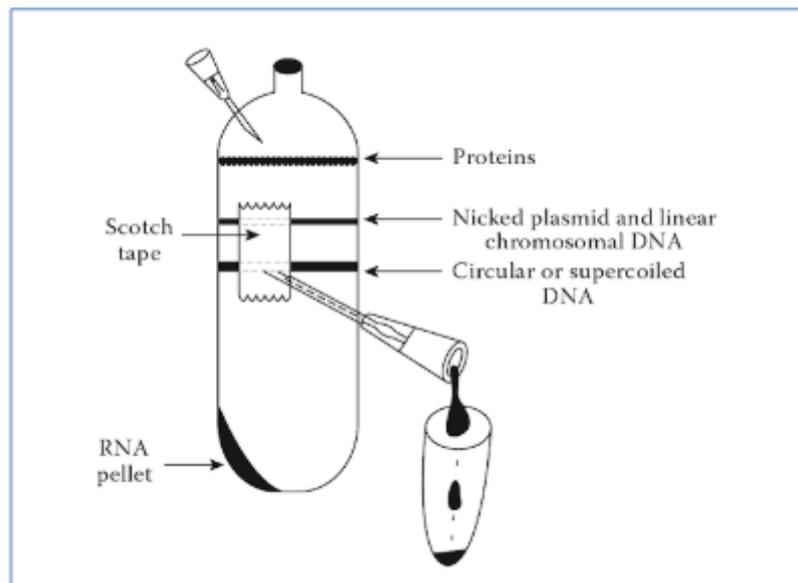


Figure 9 : Purification de plasmide sur gradient de Chlorure de Césium (Cseke *et al.*, 2011).

Chapitre 3 : Les Sondes.

1. Les sondes nucléotidiques

1.1. Définition

Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Cette réaction sonde-fragment correspond à *une réaction d'hybridation moléculaire*.

1.2. Caractéristiques générales

Une sonde nucléotidique peut être soit une séquence d'ADN ou d'ARN, mais *obligatoirement monobrin*. Sa taille est très variable : oligonucléotide de 20-30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides. La sonde est complémentaire et antiparallèle du fragment recherché. Dans un mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage avec un radioisotope (marquage chaud), mais il existe également des sondes appelées sondes froides sans marquage par un radioisotope.

1.3. Obtention d'une sonde

Il existe plusieurs possibilités pour obtenir une sonde nucléotidique :

- Une sonde oligonucléotidique peut être fabriquée par synthèse chimique, si la séquence de l'ADN à repérer est connue. Si elle est inconnue, on peut étudier la protéine correspondante et remonter grâce au code génétique à la séquence d'ADN. Dans ce dernier cas, le travail est particulièrement laborieux (nombre de codons élevé pour un même acide aminé).
- Une sonde peut être un ADNc. Une partie seulement du ADNc est utilisée (après action d'enzymes de restriction et clonage des fragments obtenus).
- Une sonde peut être théoriquement du mARN.

2. Les agents de marquages :

Le marquage est principalement employé dans toutes les techniques qui utilisent une sonde (hybridation, Northern). On distingue le marquage dit 'chaud' utilisant des isotopes radioactifs, et les marquages 'froids' qui utilisent des molécules aux propriétés fluorescentes, luminescentes. Ces dernières sont de plus en plus employées car plus pratiques.

2.1. Les isotopes radioactifs : Par définition un isotope radioactif est constitué d'un noyau atomique instable qui se désintègre spontanément en un noyau plus stable (isotope radiogénique) en émettant de l'énergie sous forme d'un rayonnement.

On distingue plusieurs méthodes selon la localisation du marquage (extrémités ou interne à la molécule) et selon la nature de la séquence marquée (simple ou double brin).

Le Phosphore 32 est le radioisotope le plus utilisé. Incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triphosphate radiomarqués Il existe des sondes monos ou double brins Soufre 35, H3 utilisés plutôt pour le séquençage et hybridation in situ. On peut aussi réaliser un marquage en 5' : avec la T4 polynucléotide kinase. La radioactivité est aussi utile pour le marquage des oligonucléotides de synthèse.

2.2. Marquage non radioactif : Le marquage non radioactif des acides nucléiques implique l'incorporation de nucléotides portant un groupement chimique ou une molécule pouvant être détecté facilement et spécifiquement. Le groupement incorporé peut servir lui même de marqueur et être détecté par une mesure directe dans le dosage. On utilise souvent un fluorophore (Tableau 1), groupement chimique qui peut facilement être détecté car il absorbe l'énergie d'une certaine longueur d'onde qui lui est spécifique (longueur d'onde d'excitation) et la réémet à une longueur d'onde plus longue (longueur d'onde d'émission), mais également spécifique.

Alternativement, une mesure indirecte peut être utilisée. Un groupement chimique incorporé sert de rapporteur spécifiquement reconnu et lié par une molécule d'affinité, comme un anticorps dédié. La molécule d'affinité a un groupement marqueur qui lui est lié, un groupement chimique ou une molécule, qui peut alors être facilement dosé (Figure 09).

Tableau 1 : Fluorophores pour le marquage des acides nucléiques.

Fluorophore	Longueurs d'onde maximales (nm)	
	Excitation	Émission
Bleu		
AMCA	350	450
DAPI	358	461
Vert		
FITC	492	520
Fluorescéine	494	523
Rouge		
CY3	550	570
TRITC	554	575
Rhodamine	570	590
Rouge Texas	596	620
CY5	650	670

AMCA, aminométhylcoumarine ; DAPI, 4', 6- diamino- 2- phénylindole ; FITC, fluorescéine isothiocyanate ; CY3, indocarbocyanine ; TRIT, tétraméthylrhodamine isothiocyanate ; CY5, indodicarbocyanine.

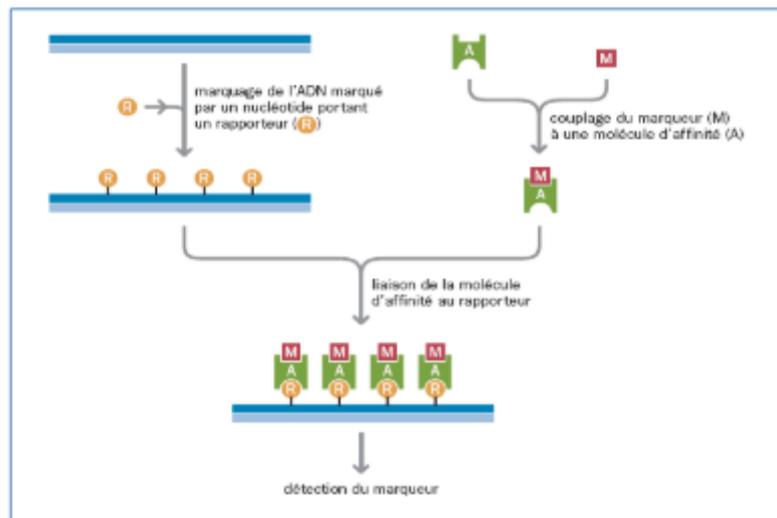


Figure 10 : Détection indirecte de groupements marqués dans les acides nucléiques.

Les acides nucléiques peuvent être marqués par des groupements chimiques qui ne sont pas détectés directement. Les groupements incorporés servent plutôt de groupements rapporteurs car ils sont liés avec une grande spécificité par une molécule d'affinité qui, elle, porte un marqueur détectable. Ce marqueur peut être détecté de différentes façons. Si c'est un colorant fluorescent, il pourra être détecté par microscopie de fluorescence. Fréquemment, l'alternative est d'utiliser une enzyme, comme la phosphatase alcaline, qui convertit un substrat pour donner un produit coloré qui peut être dosé par colorimétrie.

Deux techniques sont largement utilisées pour détecter un marquage indirect. Le système à biotine- streptavidine repose sur la très grande affinité entre deux ligands naturels. La biotine (une vitamine) agit en tant que rapporteur car elle est spécifiquement liée par la streptavidine, une protéine bactérienne, avec une constante d'affinité (aussi appelé constante de dissociation) de 10^{-14} , une des plus élevées qui soit connue en biologie. Les sondes biotinylées peuvent être facilement obtenues en incluant un nucléotide adéquat biotinylé au cours de la réaction de marquage. La streptavidine sert alors de molécule d'affinité révélatrice. Un autre rapporteur largement utilisé est la digoxigénine. Un anticorps spécifique contre la digoxigénine sert de marqueur d'affinité.

3. Quelques stratégies de marquage :

3.1. La « Nick translation » ou déplacement de cassure

La technique de nick translation (déplacement de cassure) repose sur la réparation de cassures (nicks) simple brin dans l'ADN, formant des extrémités 3' OH et 5' P terminales exposées. Cette cassure peut être obtenue en utilisant une endonucléase appropriée, comme la désoxyribonucléase I du pancréas (ADNase I). La cassure ainsi exposée va alors servir de point de départ pour l'introduction de nouveaux nucléotides en utilisant l'ADN polymérase d'E. coli, une enzyme composée de nombreuses sous-unités qui possède des activités d'ADN polymérase et d'exonucléase 5' → 3'. Alors que l'ADN polymérase ajoute de nouveaux nucléotides à l'extrémité 3'-hydroxyle de la cassure, les nucléotides sont supprimés à l'autre extrémité de la cassure par l'activité exonucléasique 5' → 3' de la même enzyme. La cassure est ainsi progressivement déplacée le long de l'ADN dans la direction 5' → 3' (Figure 10). Si la réaction est réalisée à une température relativement faible (environ 15 °C), elle ne se poursuit par au-delà du renouvellement complet de la séquence nucléotidique existante. Bien qu'il n'y ait pas de synthèse nette d'ADN à cette température, la réaction de synthèse permet l'incorporation de nucléotides marqués à la place de ceux qui existaient précédemment dans le nucléotide non marqué.

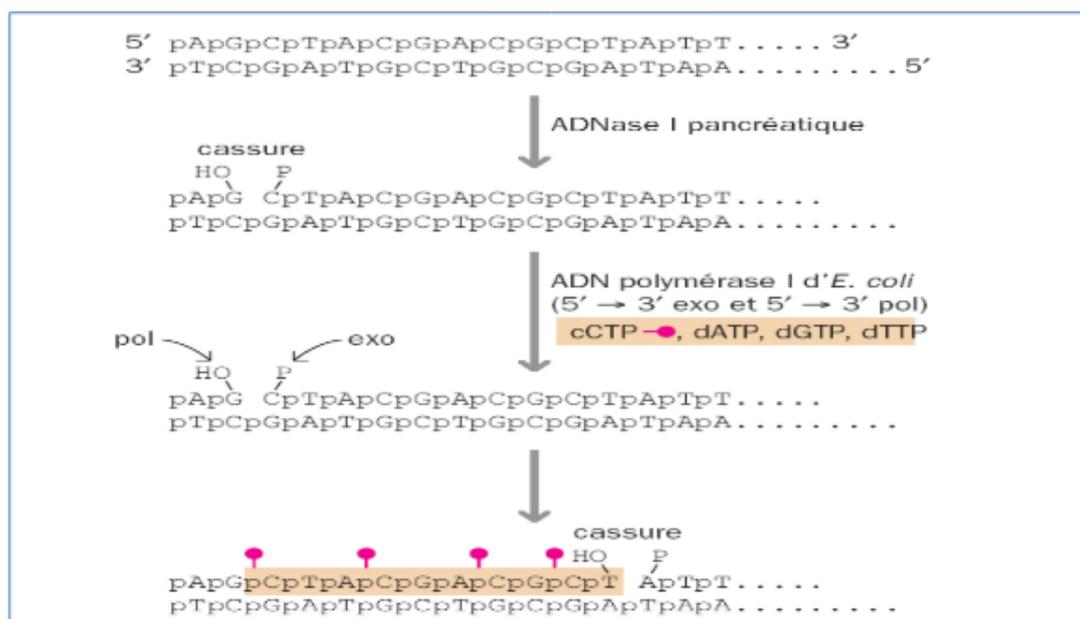


Figure 11 : Marquage de l'ADN par nick translation (déplacement de cassure).

3.2. La « Random printing » ou Marquage de l'ADN à l'aide d'amorces aléatoires

La technique de marquage de l'ADN à l'aide d'amorces aléatoires repose sur l'hybridation d'un mélange de nombreux hexanucléotides différents qui se lient au hasard à des séquences complémentaires de l'ADN matrice dénaturé, et initient la synthèse de nouveaux brins d'ADN (Figure 11). La synthèse des nouveaux brins complémentaires est catalysée par la sous-unité de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (qui contient l'activité de polymérase sans l'activité exonucléasique 5' → 3' associée).

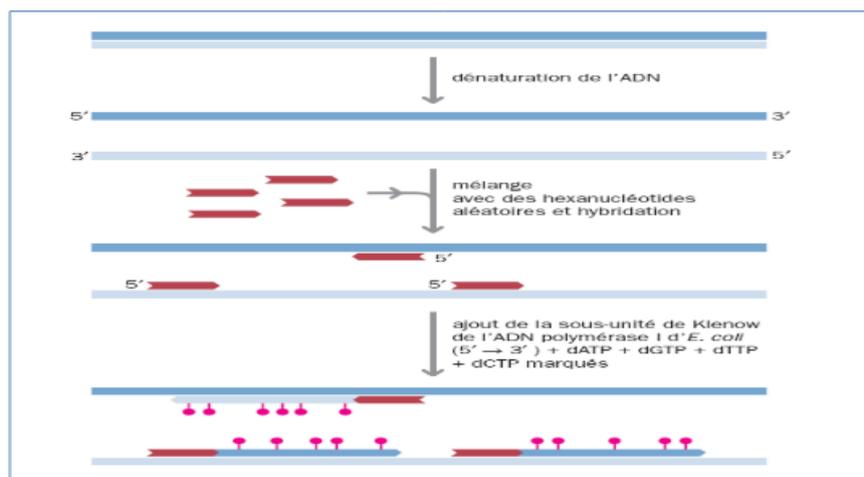


Figure 12 : Marquage de l'ADN par amorce aléatoire.

3.3. Le marquage des sondes synthétiques (Oligo-nucléotides de synthèse) :

La réaction classique de PCR peut être facilement modifiée pour inclure un ou plusieurs précurseurs nucléotidiques marqués qui s'incorporeront dans les produits de PCR sur toute leur longueur.

3.4. Les sondes ARN (ribosondes) : Des sondes à ARN (ribosondes) peuvent être obtenues par transcription *in vitro* d'ADN cloné dans un vecteur d'expression plasmidique approprié. Ce vecteur contient une séquence promotrice immédiatement adjacente au site d'insertion de l'ADN étranger, assurant ainsi la transcription de la séquence insérée. Des promoteurs de phages très efficaces sont utilisés communément, comme ceux des phages SP6, T3 et T7 et la polymérase correspondant au phage est fournie afin d'assurer une transcription spécifique de l'ADN cloné. L'incorporation de ribonucléotides marqués assure un marquage à l'ARN nouvellement synthétisé (Figure 12).

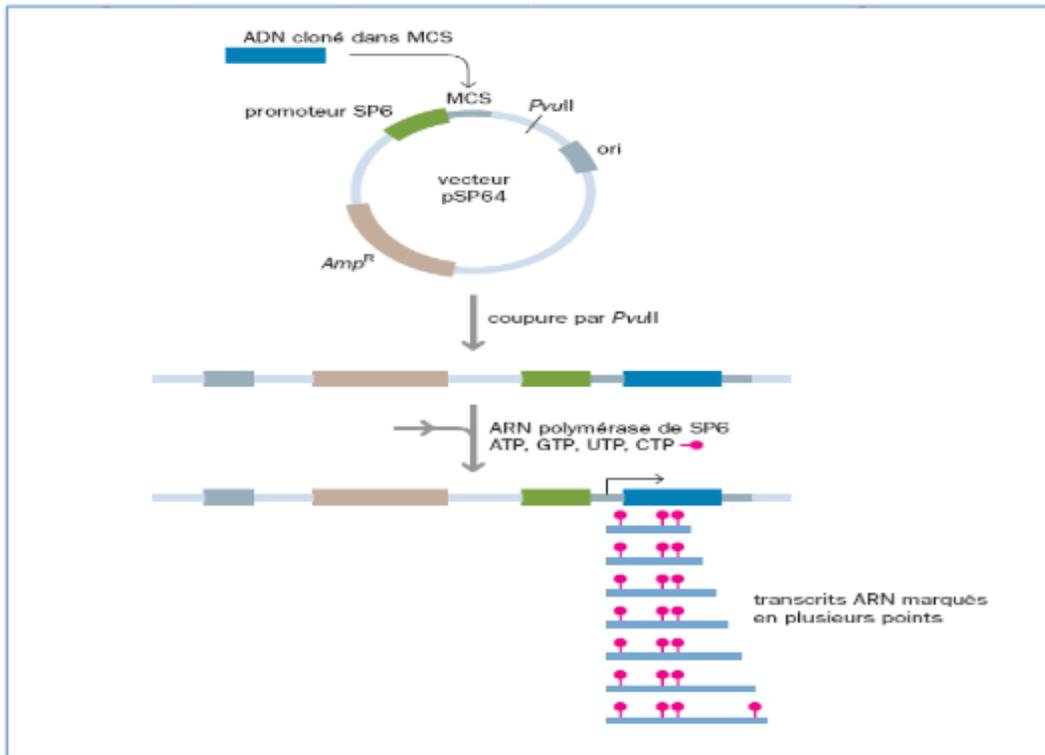


Figure 13 : Les sondes ARN sont habituellement produites par transcription d'inserts ADN clonés grâce à une ARN polymérase de phage.

Chapitre 4 : Hybridation moléculaire.

Introduction :

L'hybridation moléculaire permet de repérer ou de rechercher une molécule d'ADN ou d'ARN spécifique dans une population hétérogène. Le principe est de marquer par un traceur radioactif ou chimique la séquence d'ADN connue et purifiée que l'on veut repérer dans une population. Ce fragment monocaténaire marqué constitue la sonde. Les molécules cibles rendues monocaténares (population hétérogène d'acides nucléiques dénaturés) sont au préalable fixés sur une membrane d'hybridation en nylon ou en nitrocellulose.

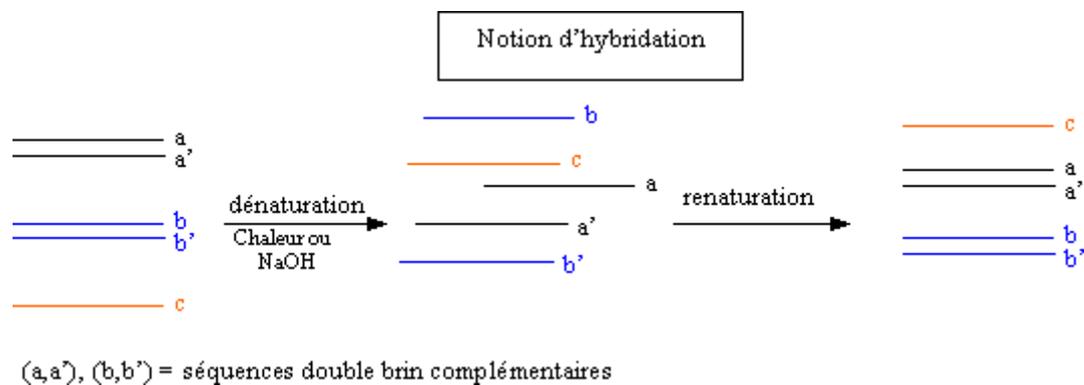
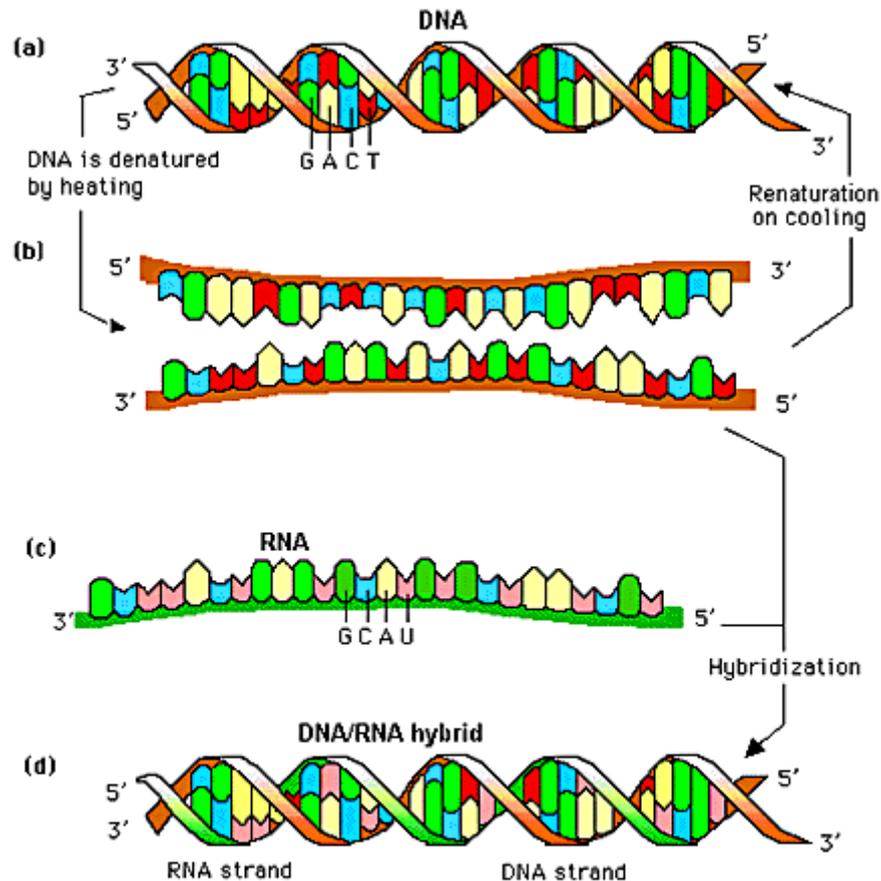


Figure 14 : Notion d'hybridation

1. Différentes techniques d'hybridation :

1.1. L'hybridation moléculaire avec la sonde

L'hybridation moléculaire sonde-fragment d'ADN à repérer nécessite des conditions physico-chimiques parfaites (tampon, pH, température, etc.). Ces conditions sont appelées *la stringence*. Plusieurs facteurs peuvent également intervenir comme la longueur de la sonde et la complémentarité sonde-fragment avec possibilité de mauvais appariements.



Nucleic Acid Hybridization

Figure 15 : les étapes d'hybridation.

1.2. Southern blotting:

La première étape de l'analyse par transfert de Southern implique une digestion enzymatique de l'ADN à analyser en utilisant une ou plusieurs endonucléases de restriction qui reconnaissent et coupent des séquences d'ADN courtes spécifiques. Il en résulte un nombre discret de fragments d'ADN de différentes tailles. Au cours de la deuxième étape du procédé, les fragments d'ADN obtenus par digestion de restriction sont séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose. Après séparation, les fragments d'ADN sont dénaturés et transférés sur un support solide tel qu'une nitrocellulose ou une membrane en nylon, par capillarité ou électrophorèse. Les fragments d'ADN sont ensuite étroitement liés et fixés à la membrane, typiquement par irradiation UV ou chaleur, puis hybridés avec une ou plusieurs sondes. Les sondes utilisées dans les analyses Southern blot peuvent être radioactives ou marquées par une enzyme. Après la préhybridation, les sondes sont ensuite appliquées sur la membrane. La sonde

sélectionnée est généralement un fragment d'ADN (ou d'ARN) avec une séquence nucléotidique spécifique complémentaire de la séquence à détecter. L'hybridation est suivie de plusieurs lavages, qui sont effectués avec des tampons d'astringence différente. La séquence cible doit alors apparaître sous forme de taches sombres sur la membrane de nitrocellulose ou de nylon (non radioactive, non chimioluminescente) ou sur le film radiographique (sonde radioactive ou chimioluminescente), et doit correspondre à la taille moléculaire attendue du fragment d'ADN (figure 16).

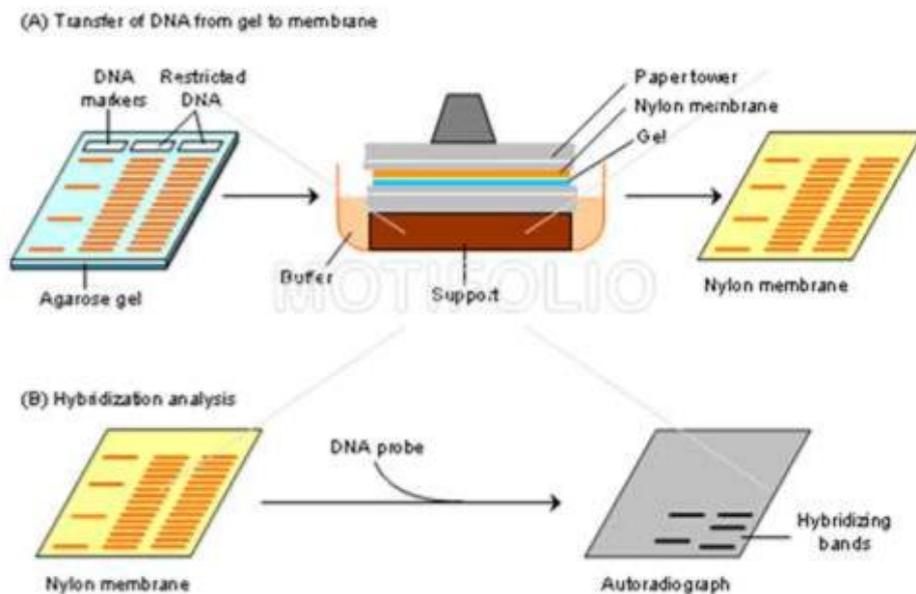


Figure 16 : Technique de *southern blot*.

Afin d'illustrer cette technologie par un diagnostic, nous prendrons l'exemple pratique de la drépanocytose. Il s'agit d'une maladie héréditaire entraînant la formation d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S, responsable de la falciformation des hématies lorsque l'oxygénation diminue. Sur le plan moléculaire, une mutation ponctuelle sur le 6^e codon du gène de la β -globine est responsable de cette anomalie. Une molécule d'adénine est remplacée par une molécule de thymine conduisant au niveau protéique. Principe : la mutation est directement utilisée pour le diagnostic. Plusieurs enzymes de restriction reconnaissent de façon spécifique l'ensemble des codons 5-6-7, et ne peuvent plus exercer leur effet si le codon 6 est muté.

En plus, Le transfert de Southern a de nombreuses applications de recherche et cliniques. Par exemple, la technique est utilisée en clinique diagnostic moléculaire de la dystrophie myotonique. Le désordre est causé par l'expansion anormale d'une région du trinucleotide CTG

se répète dans le gène DMPK. Les individus non affectés ont 5 à 35 copies de la répétition CTG, tandis que les individus affectés peuvent avoir plusieurs milliers d'exemplaires. Un nombre normal ou légèrement agrandi de répétitions est détecté par PCR. Le nombre de répétitions dans un allèle avec une grande expansion est déterminé par la taille des bandes sur un *Southern blot*.

1.3. Northern blotting

Les northern blots sont également basés sur l'hybridation d'acide nucléique. La différence est que l'ARN est la cible d'un transfert Northern. La dénaturation est inutile, mais tout le reste de la technique est similaire au *Southern blot*. La sonde pour un transfert de Northern est soit un fragment d'un gène, soit un oligonucléotide unique. Les Northern blots commencent par séparer l'ARNm par taille en utilisant l'électrophorèse. L'ARNm est transféré sur une membrane en nylon et incubé avec une sonde marquée monocaténaire. Comme précédemment, la sonde peut être marquée avec de la biotine, de la digoxigénine ou de la radioactivité. La membrane est traitée et exposée à un film ou à un substrat chromogène. Ici, l'échantillon cible n'est pas séparé par taille. La cible d'ARNm est simplement attachée à la membrane de nylon sous la forme d'un petit point (figure 17).

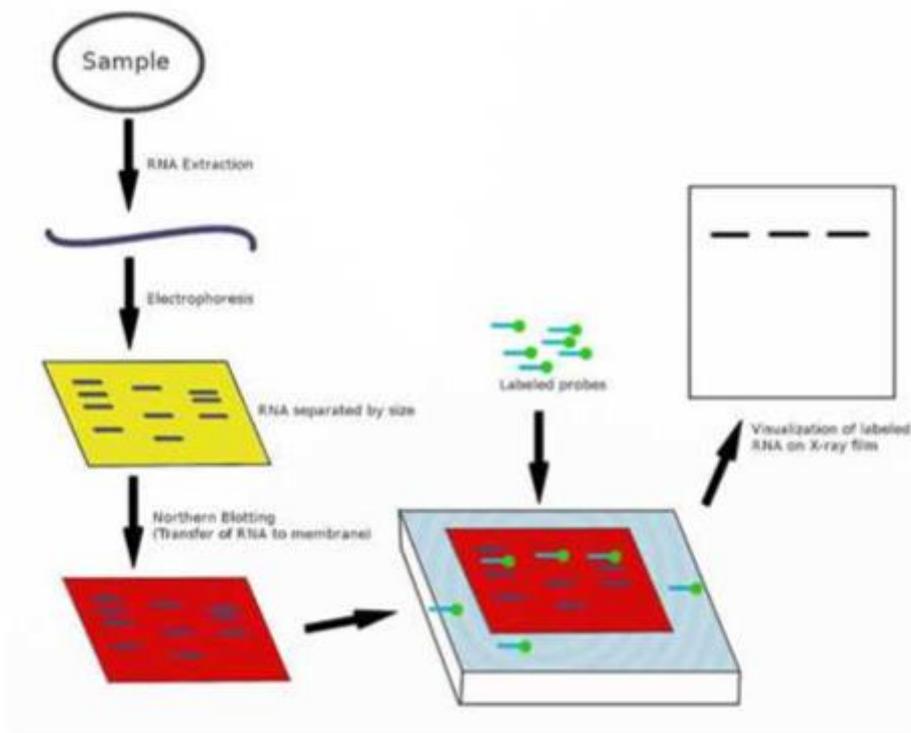


Figure 17 : Technique de *Northern blot*.

1.4. Dot Blot :

Cette technique permet de quantifier un ARN ou fragment d'ADN donné sans séparation préalable sur gel d'électrophorèse.

1.5. Hybridation *in situ* (HIS) :

On appelle hybridation *in situ* (HIS) l'utilisation de sondes d'acides nucléiques pour mettre en évidence et localiser, dans des cellules ou des tissus, des séquences d'acides nucléiques, complémentaires de la sonde par leurs bases. L'HIS est un outil incomparable pour étudier l'expression des gènes.

Elle est très proche, dans son principe, des Southern et des Northern blots et repose, comme eux, sur l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique (ADN ou ARN) marquée avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques que l'on cherche à identifier et à localiser. Mais les Southern et Northern blot se font sur des broyats de tissus, alors que l'HIS s'effectue sur une coupe histologique de tissu, apportant ainsi des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés. Les sondes utilisées sont le plus souvent de l'ADN (double brin ou plus rarement monobrin) ou un ARN-messager (riboprobe) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides).

Le marquage des sondes peut être réalisé par des isotopes radio-actifs (« sondes chaudes » : tritium H³, phosphore P³² ou P³³, soufre S³⁵) ou par des produits non radio-actifs (sondes dites « froides ») soit fluorescents (FISH) soit non-fluorescents comme la biotine (« sondes biotinylées »), la digoxigénine ou des enzymes (phosphatase alcaline par exemple). Le mode de révélation varie en fonction de la nature du marquage, autoradiographies en cas de sondes radioactives, microscopie à fluorescence en cas de FISH, avidine ou streptavidine pour la biotine, anticorps marqués par un enzyme et/ou par l'or colloïdal pour la digoxigénine, anticorps ou chromogènes pour les enzymes. Le comptage des grains d'argent sur les autoradiographies permet une étude quantitative (ou plutôt semi-quantitative).

Primitivement décrite pour la microscopie optique, l'HIS est actuellement tout à fait réalisable en microscopie électronique grâce en particulier à l'introduction de milieux d'inclusion hydrosolubles comme le Lowicryl. L'or colloïdal est considéré comme le marqueur de choix pour les méthodes d'HIS en ME. Plusieurs tailles de grains (permettant des doubles marquages) peuvent être utilisées (0.8 à 20 nm) ; la taille des grains peut être augmentée par des méthodes à l'argent

1.6. Hybridation sur colonies :

Transfert de colonies de cellules d'une boîte de Petri sur un filtre ou une membrane avant de procéder à une hybridation moléculaire de leur matériel génétique avec une sonde marquée.

1.7. Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

L'hybridation *in situ* en fluorescente est une méthode d'analyse du génome très éclectique puisqu'elle peut s'appliquer aussi bien aux noyaux interphasiques qu'aux préparations chromosomiques. En outre, elle permet de cibler des chromosomes entiers, des régions chromosomiques spécifiques (centromères). On parle d'hybridation *in situ* quand l'expérience d'hybridation est faite directement sur des préparations cytogénétiques ou cytologiques sans que l'architecture du chromosome ou de la cellule ne soit modifiée.

Le principe de FISH est fondé sur la propriété de réassociation spécifique des acides nucléiques. Une sonde dénaturée (ADN simple brin marqué) en solution peut s'hybrider spécifiquement avec sa séquence cible (préparation chromosomique dénaturé) grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques. La sonde s'apparie par des liaisons hydrogène établies selon les critères de Watson et Crick. Les hybrides infidèles et les molécules de sonde non hybridées sont éliminés par lavages, puis les hybrides spécifiques sont révélés, en général par immunodétection et enfin l'observation s'effectue grâce à un microscope à épifluorescence. Cette méthode permet de visualiser simultanément plusieurs sondes différentes marquées par des fluorochromes différents. Les résultats sont obtenus en quelques heures, au lieu de plusieurs semaines pour l'hybridation *in situ* radioactive. Il est possible de visualiser par FISH des cibles uniques de l'ordre de quelques kilobases en utilisant des petites sondes. Par rapport au marquage radioactif, en plus de la sécurité, de la stabilité du marquage dans le temps et de la commodité de détection, la FISH offre une résolution spatiale incomparable. Celle-ci est telle que l'on peut aisément distinguer le marquage d'un gène sur deux chromatides sœurs (figure 18).

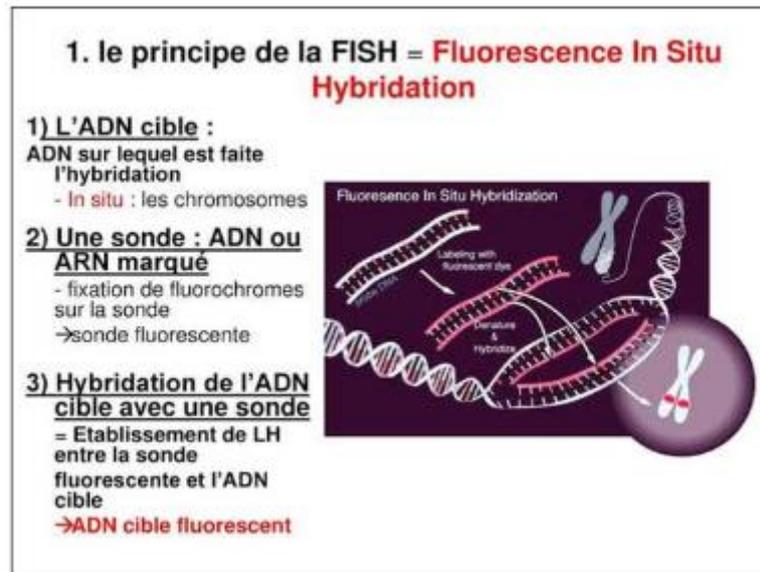


Figure 18 : Technique d'hybridation in situ en fluorescence (FISH).

Pour l'application de FISH dans la clinique on a : la phylogénie qui est l'étude des remaniements chromosomiques ; établissement d'un arbre phylogénétique selon les homologies de séquences. L'arbre phylogénétique de séquences est donc une proposition parmi d'autres arbres phylogénétiques dont les informations peuvent être complémentaires ou très différentes, Etude de l'évolution des caryotypes avec le "chromosome painting" en plus CTs (chromosome territories) par la détection de la position spécifique des chromosomes en interphase dans le noyau. Diagnostics cytogénétiques mise en évidence de maladies génétiques (trisomies, tumeurs...).

Chapitre 5 : Clonage.

Introduction :

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.

1. Sources et préparation de l'ADN à cloner

Le Génie Génétique est l'ensemble de techniques permettant de modifier artificiellement la composition génétique (génome) des cellules ou des organismes. Le terme Génie Génétique a été introduit au milieu des années 70. Ces différentes méthodes peuvent être regroupées en deux voies : la voie descendante, des acides nucléiques vers la protéine et la voie ascendante, des protéines vers les acides nucléiques. Le génie génétique utilise des outils cellulaires et moléculaires :

1.1. Outils cellulaires

L'isolement et l'amplification d'un gène impose son clonage et sa multiplication dans des cellules de procaryotes (bactéries) (*E. coli* se divise très rapidement environ 20mn) ou d'eucaryotes pouvant être mises en culture in vitro.

A partir de cellules données, il y a isolement d'un gène à cloner du génome de cette cellule et sa multiplication dans d'autres cellules appelées cellules hôtes.

Cet isolement et cette multiplication nécessitent l'utilisation d'outils moléculaires adaptés.

1.2. Outils moléculaires :

Des enzymes de restriction permettent de travailler sur les acides nucléiques de l'ADN, de le modifier, de le couper, de recoller les morceaux etc...

Les vecteurs sont capables de transporter l'ADN d'intérêt (d'où le nom de vecteur) dans différents types d'hôtes, c'est un morceau d'ADN capable d'autoréplication. Ce sont les vecteurs de clonage.

1.2.1. ADN génomique

L'ADN génomique (ADNg) est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers en fonction de la taille de l'organisme. Pour un organisme donné on part de n'importe quel lot de cellules, l'ADN génomique sera le même. A partir du sang (lymphocytes) environ 10 ml, une extraction d'ADN peut être réalisée par les techniques nécessaires sous forme de longs filaments correspondant à l'ADN de haut poids moléculaires. Ces longues chaînes d'ADN peuvent être coupées par une ou plusieurs enzymes de restrictions en fragments de tailles variables.

1.2.2. ADN complémentaire

L'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu à partir d'ARNm, qui servira à l'obtention d'une banque ADNc. Cet ADN ne contient que les séquences codantes d'un gène (Figure 19).

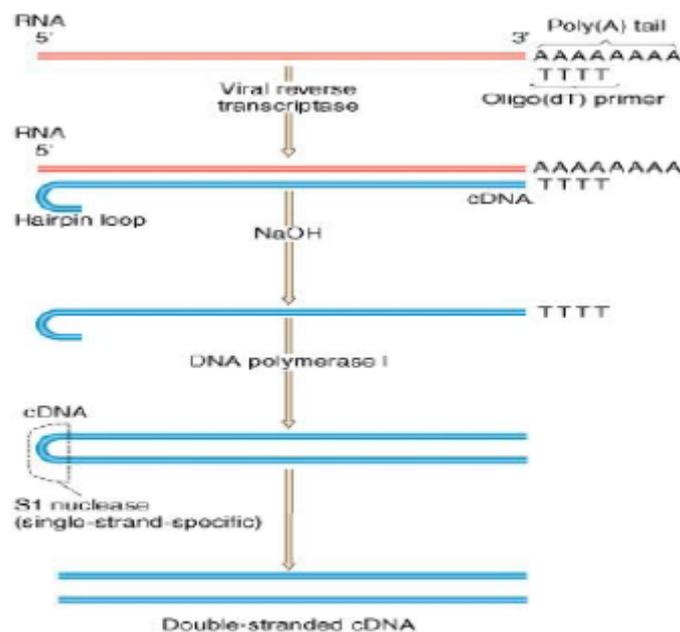


Figure 19 : Synthèse d'ADNc double brin à partir d'ARNm.

1.2.3. ADN synthétique :

Cet ADN est produit de façon chimique et synthétique pour des petits fragments de l'ordre de 50 à 100 bases par des automates. Ce type d'ADN est utilisé comme sonde ou amorces pour le criblage. 4. Notion de banques d'ADN génomique et complémentaire Une banque d'ADN est un ensemble de larges fragments d'ADN d'un génome d'intérêt qui sont clonés dans un vecteur répliquatif (exemple : plasmide) et introduit dans une cellule hôte facile à répliquer. On distingue deux types de banque ADN :

2. Banque d'ADN

2.1 Banque d'ADN génomique : Une banque d'ADN génomique est un ensemble de vecteurs recombinants contenant chacun un fragment différent du génome de l'espèce étudiée. Le principe consiste à : (i) extraction de l'ADN génomique de l'espèce d'intérêt ; (ii) les enzymes de restriction sont utilisées pour cliver l'ADN génomique en plusieurs fragments permettant de libérer des fragments de restriction de taille compatible avec le vecteur choisi ; (iii) incorporation des fragments d'ADN dans des vecteurs, par exemple dans de l'ADN de phage, et sont répliqués dans des bactéries (Figure 19). La banque obtenue est ainsi constituée de millions de clones recombinants.

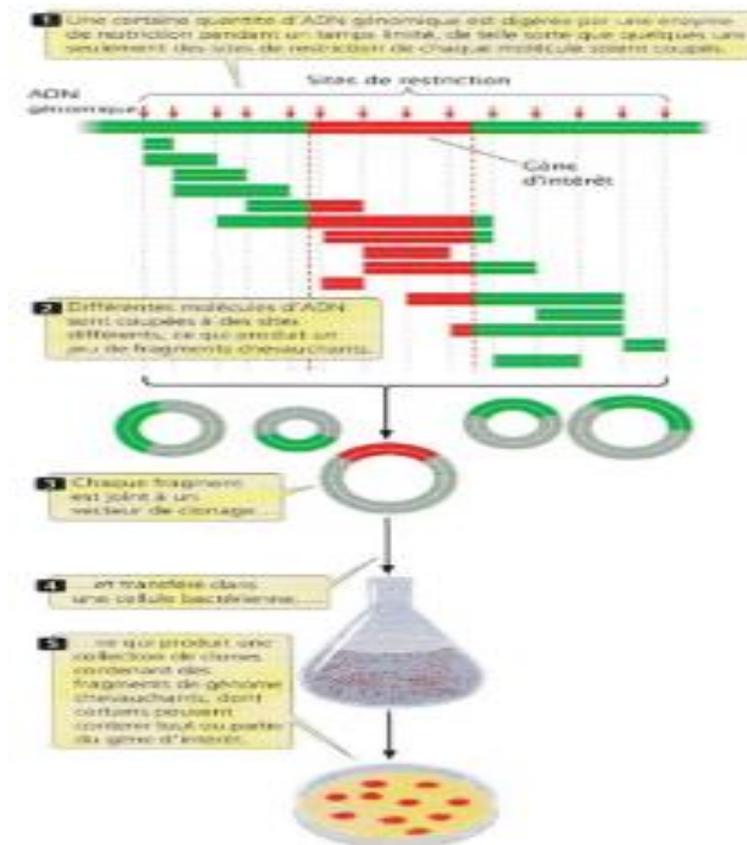


Figure 20 : Principe de construction d'une banque plasmidique d'ADN génomique total.

Une banque génomique est caractérisée par :

- Le type de vecteur utilisé (plasmide, cosmide, phage, YAC...);
- La nature des inserts (ADNg, ADNc) et leur origine ;
- Le pourcentage de vecteurs possédant un insert ;
- La taille moyenne des inserts ;
- La taille de la banque (quantité de clones).

Avantages des banques génomiques Les banques génomiques permettent de connaître :

- Les régions transcrites non traduites 5'UTR et 3' UTR ;
- Les séquences de régulation ;
- Les gènes silencieux transcrits et non traduits ;
- Les pseudogènes non transcrits et non traduits ;
- Les introns ;
- Les gènes chevauchants.

2.2 Banque ADN complémentaire (ADNc)

Les populations d'ARNm accumulées dans un tissu donné sont représentatives de ce tissu. Il est donc de première importance de pouvoir caractériser les gènes exprimés dans un organe déterminé. Mais la manipulation des ARNm est délicate (faible quantité, sensibilité aux nucléases) et il est nécessaire de transformer ces ARNm en ADN bicaténaires aisément manipulables et adaptés à des clonages dans des vecteurs bactériens. Une banque d'ADNc (ADN complémentaire) est donc représentative des populations d'ARNm présentes dans un tissu donné à un stade déterminé de son développement. Contrairement à la banque génomique, une banque d'ADNc sera spécifique d'un tissu. Une banque d'ADNc peut être considérée comme "une photographie instantanée" des populations d'ARNm représentées dans un organe.

La construction d'une banque d'ADNc nécessite de nombreuses étapes (Figure 20). Le principe repose sur :

- (i) l'extraction d'ARN et parfois la purification des ARNm polyadénylés de l'organe (par exemple par chromatographie d'affinité sur une colonne polyT) 1 ;
- (ii) la copie de ces ARNm en ADN complémentaires par l'action d'une transcriptase inverse ;
- (iii) l'élimination spécifique des ARNm par l'ARNase H ou la soude ;
- (iv) la synthèse du second brin d'ADN par une ADN polymérase ;
- (v) la ligature d'oligonucléotides (adaptateurs) pour créer des sites de restriction ;
- (vi) la ligature dans un vecteur de clonage (plasmide ou phage) ;
- (vii) l'intégration des vecteurs recombinants dans une bactérie.

Les vecteurs de clonage utilisés pour la construction de banques d'ADNc sont soit les plasmides, soit les phages. Les étapes de synthèse du second brin d'ADN et de ligature d'adaptateurs sont de plus en plus souvent réalisées à l'aide de la PCR. La synthèse du brin d'ADNc est amorcée généralement par fixation d'une courte séquence polyT sur l'extrémité polyA de l'ARNm. Une autre approche consiste à utiliser comme amorce pour la synthèse du brin d'ADNc par la transcriptase inverse un mélange d'hexanucléotides synthétiques correspondant à de nombreuses séquences différentes et s'hybridant au hasard sur l'ARNm. Cependant, comme par définition l'amorçage de la synthèse de l'ADNc se fait sur des parties internes des ARNm, les ADNc obtenus ne correspondent qu'à des fragments d'ARNm.

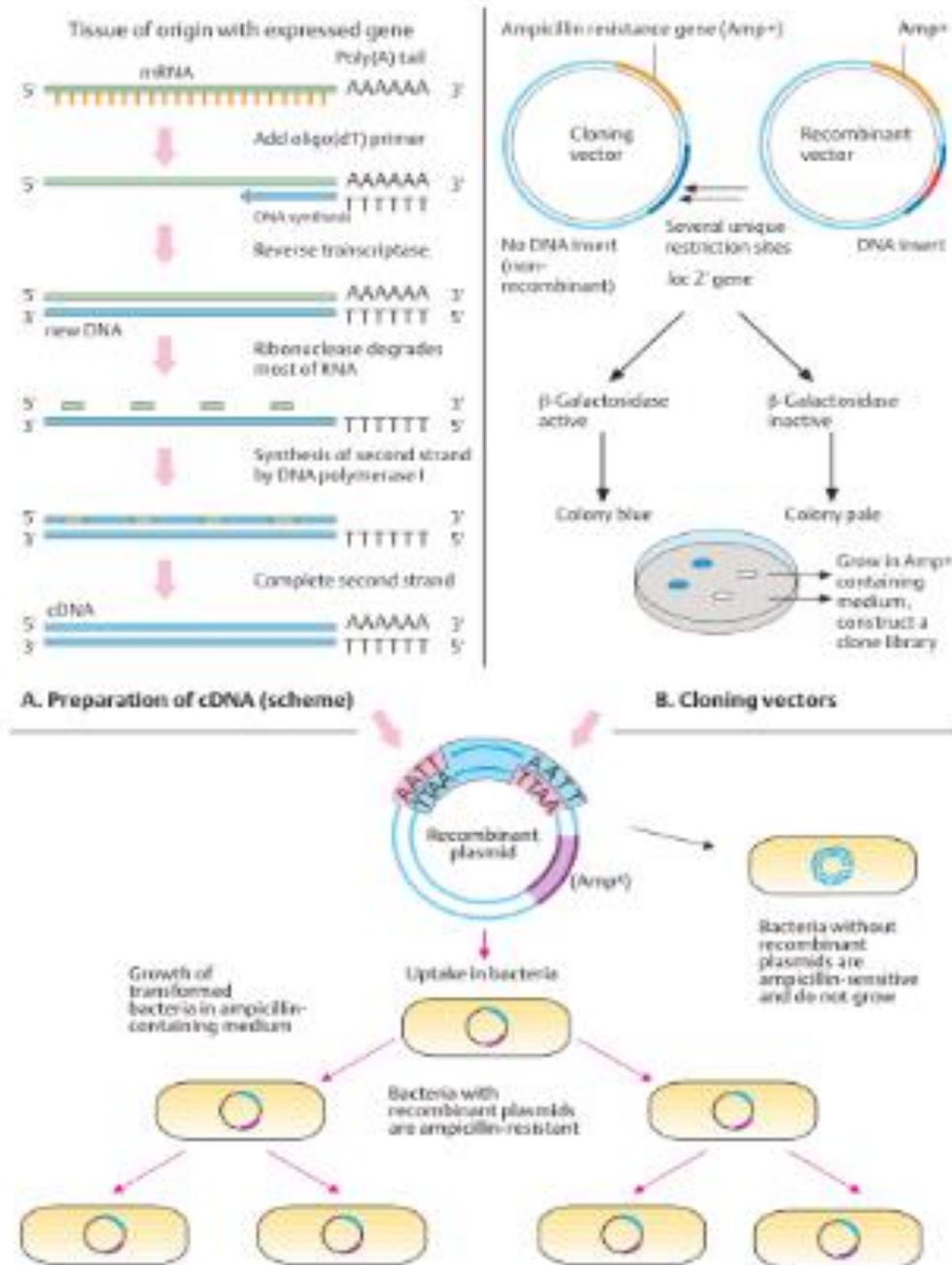


Figure 21 : Principe du Clonage de l'ADNc.
(<https://www.magazinescience.com/tag/adnc/?print=print-search>).

L'ADN complémentaire (ADNc) et l'ADN génomique sont deux types de molécules d'ADN utilisées dans les expériences de recherche en biologie moléculaire. L'ADNc et l'ADN génomique sont tous deux constitués de nucléotides d'ADN. L'ADNc est produit par la transcription inverse de l'ARN extrait du tissu. Les types d'ARN utilisés pour la transcription

inverse peuvent être l'ARN total, le pré-ARN, l'ARN, l'ARN ribosomal, ou l'ARNt. Cependant, l'ADN génomique peut être directement isolé de la cellule. La différence principale entre l'ADNc et l'ADN génomique est que l'ADNc représente le transcriptome d'un organisme particulier alors que l'ADN génomique représente le génome (Tableau 2).

Tableau 2 : Différence entre une banque d'ADNg /ADNc.

	Banque d'ADNc	Banque d'ADNg
Origine de l'ADN	ADNc obtenus par reverse transcription d'ARNm, or la présence d'un messenger donné dépend du tissu étudié. Le tissu et le stade de développement est à spécifier.	ADNg de n'importe quelle cellule. Digestion partielle pour obtenir des clones chevauchants.
Type de vecteur de clonage utilisé / Taille des fragments d'ADN	Plasmides : insert < 5-10 kb Phages : insert < 20 kb	Cosmides : insert < 45 kb BAC: insert < 300 kb YAC: insert < 1000-2000 kb
Utilisation	Production de protéines recombinantes. Absence d'introns dans la séquence d'ADNc : identification des cadres de lecture ouverts	Caractérisation d'une séquence génomique particulière (connaître la structure d'un gène, son promoteur). Établissement de cartes physiques d'un génome. Séquençage à grande échelle de portions ou de la totalité du génome

3. Les vecteurs de clonage : plasmides ; cosmides ; BAC ; PAC ; YAC

3.1. Généralités :

On appelle *vecteur* l'ADN dans lequel on insère le fragment d'ADN à étudier. L'ADN inséré est appelé insert ou ADN étranger ou ADN exogène. Cette séquence nucléotidique est capable de s'auto-répliquer.

Les vecteurs sont donc des petits ADN dans lesquels on insère un fragment d'ADN que l'on veut étudier. Ces petits ADN sont généralement des plasmides ou des bactériophages. Il est nécessaire d'introduire ces bactériophages ou plasmides dans les bactéries pour réaliser une multiplication de ceux-ci.

3.2. Les plasmides :

Les plasmides sont des petits fragments d'ADN circulaire présents dans la cellule bactérienne et indépendants du génome bactérien.

3.2.1. Propriétés générales des plasmides :

Les plasmides présentent les caractéristiques suivantes :

- Leur ADN est bicaténaire, circulaire avec un nombre de nucléotides inférieur à 10 kb (1 kilobase = kb = 1000 nucléotides).
- Le nombre de plasmides dans une cellule bactérienne peut être considérable (plusieurs centaines).
- Les plasmides portent normalement des gènes qui leur confèrent un avantage sélectif, par exemple une résistance à un antibiotique.
- Leur réplication est indépendante de celle du génome bactérien.

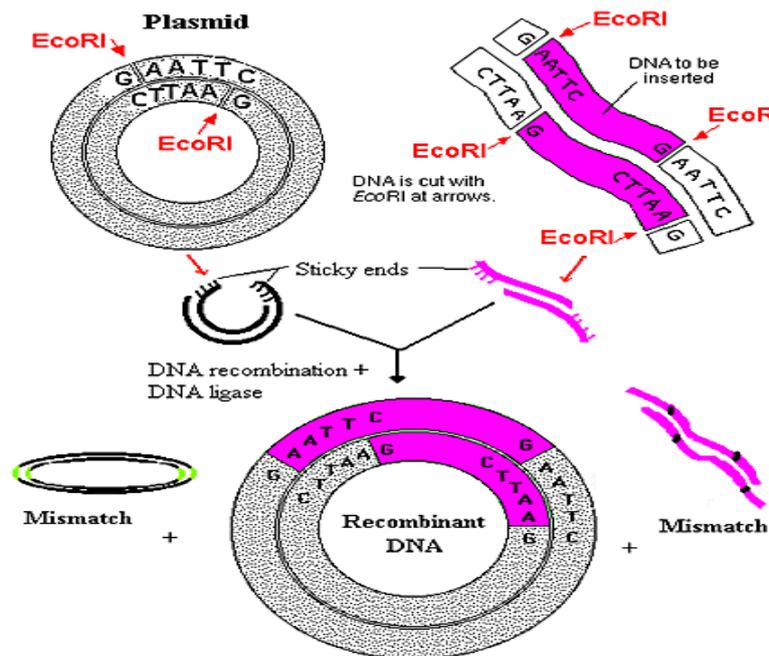
3.2.2. Préparation des plasmides :

Les bactéries contenant les plasmides sont mises en culture dans un grand volume (jusqu'à 2 litres de milieu de culture). Quand la concentration bactérienne atteint une valeur suffisante, on traite par un antibiotique (comme le chloramphénicol) qui empêche la croissance bactérienne sans affecter la réplication des plasmides. On récupère les bactéries par centrifugation. Puis, on perméabilise la paroi bactérienne par un traitement doux permettant d'obtenir un passage en solution des plasmides qui sont plus légers que l'ADN bactérien. La purification des plasmides peut être ensuite réalisée par chromatographie liquide à haute performance ou ultra-centrifugation en gradient de densité.

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*.



Inserting a DNA Sample into a Plasmid

Figure 22 : Insertion d'une séquence d'ADN bicaténaire dans un plasmide.

3.2.3. 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.

3.2.4. Avantages et désavantages des plasmides

Avantages :

- Petite taille du vecteur, permettant un travail expérimental aisé.
- Sélection des plasmides recombinants (sélection par les antibiotiques).

Désavantages :

- Faible efficacité pour la transformation des bactéries (pénétration de plasmides).
- Impossibilité d'insérer des larges fragments d'ADN.

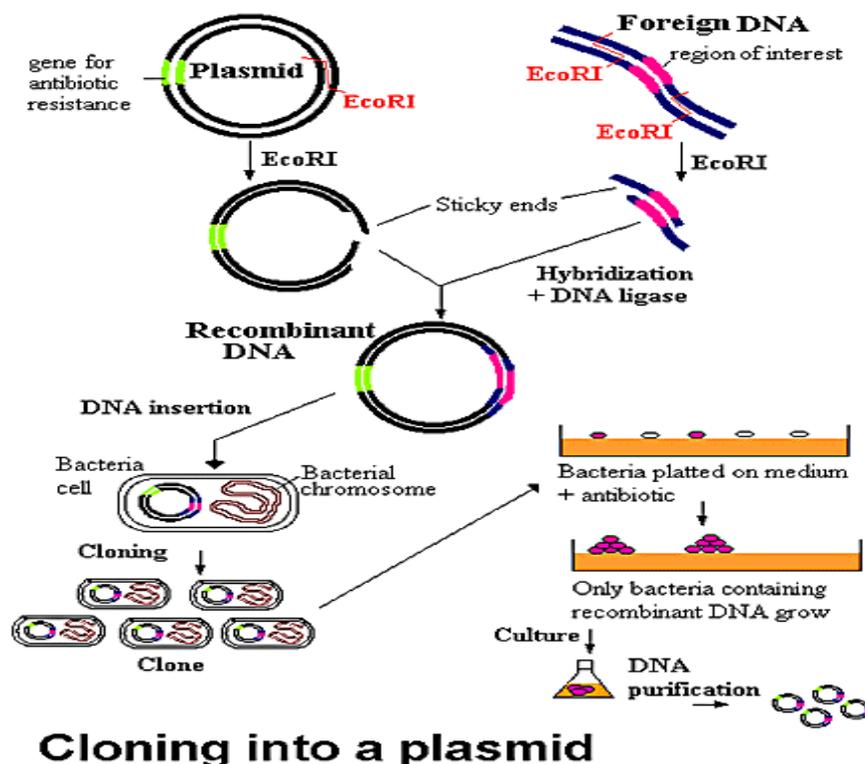


Figure 23 : Sélection des bactéries transformées par des plasmides.

3.3. Les phages :

3.3.1. Propriétés générales des phages

Les phages sont des virus qui infectent les bactéries. Deux phages sont très utilisés comme vecteurs : le phage lambda et le phage M13 (mais maintenant les phages dérivés de ces deux phages). Les séquences de ces phages utilisés comme vecteurs sont connues (40 à 50 kb d'ADN double brin). Les extrémités de cet ADN sont simples brins sur une longueur réduite, et complémentaires l'une de l'autre et surtout formant *des extrémités cohésives*. Ces séquences sont appelées *séquences cos (pour cohésives)*.

Deux parties sont individualisées dans le phage lambda :

- La tête du virus : elle renferme l'ADN viral.
- La queue du virus : elle renferme des protéines. Elle permet la fixation du virus sur la cellule-hôte bactérienne.

Le virus lambda se multiplie selon deux modes possibles : soit par *multiplication lytique*, soit par *multiplication lysogénique*.

- *La multiplication lytique.*

Le virus s'adsorbe spécifiquement à la surface des bactéries. Il injecte son ADN à la cellule-hôte. L'ADN viral se circularise dans la bactérie. Puis, une phase complexe de réplication débute et aboutit à la constitution de nombreuses particules virales à l'intérieur du cytoplasme bactérien. La lyse bactérienne provoque la libération des particules virales.

- *La multiplication lysogénique.*

Comme dans la multiplication lytique, le virus s'adsorbe et pénètre dans la bactérie. L'ADN viral s'intègre à l'ADN bactérien et sera répliqué en même que lui.

Le génome du phage lambda peut être divisé en :

- Parties essentielles comprenant :
 - les gènes codant pour les protéines situées dans la tête et les protéines situées dans la queue du virus.
 - Les sites cos.
 - Le site de réplication de l'ADN viral.
- Parties non essentielles :
 - Ce sont les gènes impliqués dans la lysogénie.

Notes complémentaires pour comprendre le fonctionnement des ARN polymérase :

Les ARN polymérase copient l'ADN double brin en ARN. Elles possèdent les propriétés suivantes :

- Elles n'ont pas besoin d'amorce pour commencer la synthèse de l'ARN.
- Elles ont besoin bien entendu des quatre nucléosides triphosphates (NTPs; N = A, G, U et C) et de Mg^{2+} .
- Elles n'ont pas de fonction d'édition.
- Elles doivent impérativement reconnaître un promoteur spécifique.
- Comme toutes les polymérase, elles synthétisent le nouveau brin dans le sens 5' à 3'.

Avantages et désavantages des phages

Avantages :

La taille des fragments d'ADN insérables est supérieure à celle des plasmides (40-50 kb).

La transformation des bactéries (=incorporation des phages) est plus efficace que pour les plasmides.

Désavantages :

Nombre de sites de restriction restreints dans le génome des phages.

Obligation d'empaqueter l'ADN.

Contraintes de taille pour l'ADN à insérer.

3.4. Les cosmides :

3.4.1. Propriétés générales des cosmides :

Les cosmides sont des vecteurs artificiels hybrides : phage lambda-plasmides. En fait, ils se comportent comme des plasmides avec des sites de restriction permettant l'insertion d'ADN étranger. Ils renferment également un gène de résistance aux antibiotiques (ampicilline). De plus, un site cos d'un virus lambda a été inclus dans leur ADN circulaire ce qui permettra au cosmide d'être empaqueté dans la tête d'un virus lambda.

Avantages et désavantages des cosmides

Avantages :

La taille des fragments insérables peut atteindre 50 kb.

Leur incorporation dans les bactéries (transformation) est plus efficace que pour les plasmides.

Désavantages :

Obligation d'empaqueter l'ADN.

3.5. Autres types de vecteurs :

D'autres vecteurs existent avec possibilité de cloner des fragments d'ADN de taille élevée (au moins jusqu'à 500 kb)

3.5.1. Les BAC :(Bacterial Artificial Chromosome)

Peuvent cloner des fragments d'ADN de taille variant de 100 à 200kb.

3.5.2. Les PAC (P1-derived Artificial Chromosome) Peuvent cloner des fragments d'ADN de taille variant de 100 à 200kb.

3.5.3. Les YAC (Yeast Artificial Chromosome : Chromosome artificiel de levure).

Peuvent intégrer des fragments de grande taille (jusqu'à 400kb). Indispensables pour analyser les grands génomes (notamment, le génome humain). A noter : pour obtenir de grands fragments d'ADN, on utilise des enzymes de restriction qui ne coupent que très rarement.

Inconvénient : les fragments insérés subissent parfois des réarrangements (insertions, chimérismes =Le **Chimérisme** survient lors d'une double fécondation "faux" jumeaux., délétions) : les YAC ne peuvent être considérés comme absolument représentatifs de la région initiale introduite.

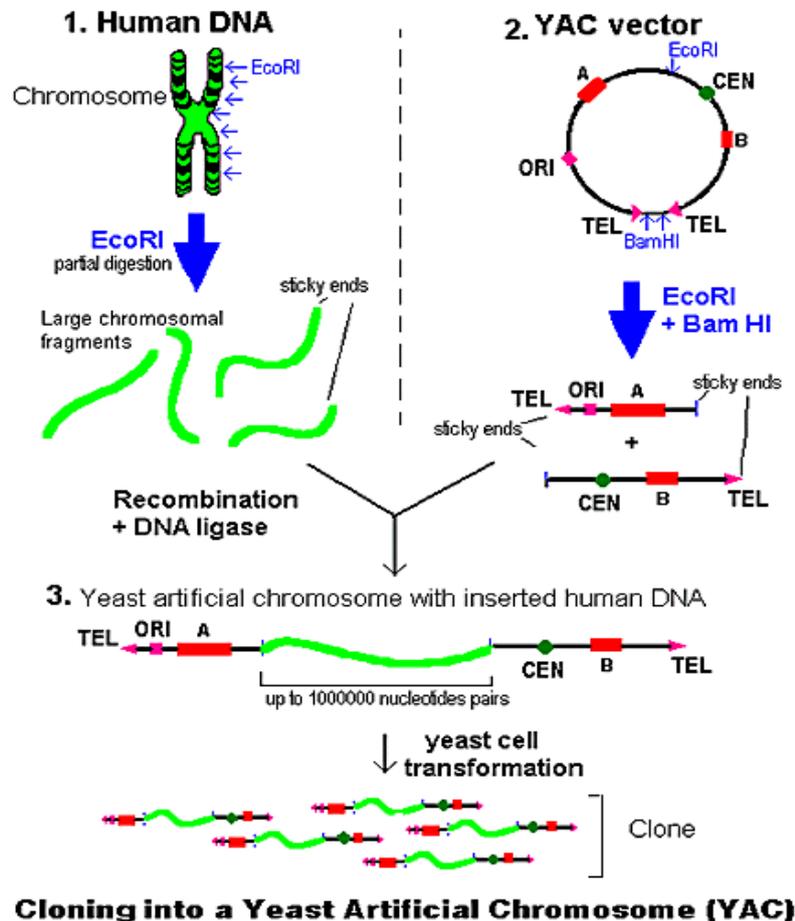


Figure 24 : Chromosome artificiel de levure. (YAC).

4. Les vecteurs d'expression et les cellules hôtes :

D'une façon synthétique, l'expression d'un ADN recombinant s'appuie sur la succession d'opérations suivantes, chacune générant ses propres difficultés :

- Tout d'abord, il s'agit d'isoler un gène d'intérêt, codant pour une protéine dont la synthèse artificielle en quantité est nécessaire : (médicament, additif, ...);
- Le gène d'intérêt est alors inséré dans un vecteur (en général un plasmide), qui doit être capable de se répliquer et de répliquer le gène étranger qui lui est rattaché ;

- La molécule d'ADN recombinant obtenue (vecteur + gène d'intérêt) est ensuite introduite dans une cellule hôte, qui exécute les instructions qui lui sont fournies par le gène d'intérêt, et réalise les modifications post-traductionnelles dans l'objectif de fabriquer la protéine recherchée. L'hôte peut être une bactérie (*E. coli*), une levure, une cellule de mammifère ou encore une plante ou un animal transgénique ;
- Il s'agit alors de passer par une phase de production, généralement en fermenteur (en ce qui concerne les micro-organismes et cellules de mammifères), afin de produire les volumes de protéine nécessaires ;
- La protéine doit enfin être récupérée puis purifiée, cette étape faisant appel à des techniques plus classiques (séparation, extraction, purification) mais pouvant se révéler longue et onéreuse ;
- Il s'ensuit des essais biochimiques et immunologiques (contrôle qualité) permettant de contrôler la pureté de la protéine obtenue, son activité, etc.

Les protéines recombinantes sont ainsi qualifiées dans la mesure où elles sont produites par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique.

Au sens large, un système de production adapté à la fabrication d'une protéine recombinante donnée, est un processus biotechnologique qui s'appuie principalement sur :

- L'emploi d'un vecteur d'expression (en général un plasmide ou un virus -pour les vecteurs eucaryotes-), jouant le rôle de transporteur génétique du gène d'intérêt codant pour la protéine recherchée ;
- L'utilisation d'une cellule hôte, chargée d'exécuter les instructions fournies par le gène d'intérêt qui lui est inséré, dans l'objectif de synthétiser la protéine recherchée ;
- Une phase de production proprement dite permettant de fabriquer les volumes de protéines souhaités ;
- Enfin, une séparation et extraction de la protéine du milieu de culture, suivie par une purification de celle-ci.

Au sens restreint, un système de production de protéines recombinantes est caractérisé par un couple constitué d'un vecteur d'expression et d'un hôte (cellule ou organisme).

Une vaste gamme de systèmes de production de protéines recombinantes -c'est-à-dire, au sens restreint, de couples vecteurs-hôtes- est aujourd'hui disponible, chacun d'eux présentant des avantages et des inconvénients. Les hôtes les plus utilisés à l'heure actuelle sont

incontestablement la bactérie *Escherichia coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules CHO extraites des ovaires de hamster.

5. Criblage de la banque d'ADN (Détection des recombinants) :

Le criblage d'une banque d'ADN peut être réalisé en utilisant plusieurs méthodes. Le criblage par hybridation de l'ADN des clones transformés avec une sonde spécifique constitue une méthode de choix. L'hybridation peut se faire in situ : on effectue des répliques de clones bactériens cultivés en boîte de Pétri sur des disques de nitrocellulose, après un temps de culture suffisant, les bactéries de ces répliques sont ensuite lysées par la soude qui, en même temps, dénature l'ADN, les molécules simple brin correspondantes se trouvent immobilisées à l'emplacement de chaque clone. Après hybridation, avec la sonde radioactive, l'autoradiographie révélera les clones positifs. Le problème est déplacé vers celui de l'obtention de la sonde spécifique, correspondant au gène recherché.

- S'il s'agit d'un gène peu évolué, on peut utiliser une sonde "hétérologue" (en fait une séquence homologue mais provenant d'un autre organisme) en comptant sur une homologie de séquence suffisante pour s'hybrider dans des conditions qui ne donnent pas de faux positifs.
- Lorsqu'une lignée cellulaire synthétise, à un moment donné du développement, un messager majoritaire, on peut tenter sa purification et réaliser un ADN complémentaire qui, une fois cloné servira de sonde pour une banque génomique.
- Si l'on connaît très bien le produit du gène, c'est à dire la séquence, même partielle, en acides aminés, on pourra construire des oligonucléotides selon les codes possibles et "partir à la pêche" avec ces sondes artificielles.
- Dans les cas désespérés, c'est à dire lorsque l'on ne possède pas de sonde et que l'on n'a aucune idée du produit du gène, connu uniquement par la manifestation phénotypique d'un allèle muté, il reste d'autres solutions, par exemple, la "marche sur chromosome" (chromosome walking) : Par des méthodes faisant appel à des croisements traditionnels et à l'analyse mendélienne, on va essayer d'associer des marqueurs RFLP au locus considéré. L'idéal étant d'encadrer le locus par des marqueurs distants de moins d'un centiMorgan. Le premier marqueur constitue une sonde pour identifier un clone (parmi une banque génomique) qui servira de départ. La cartographie de restriction nous permettra d'identifier un segment situé à une extrémité qui sera, à son tour utilisé comme sonde pour cribler un clone chevauchant et ainsi de suite jusqu'à un second

marqueur connu. La séquence recherchée se trouve obligatoirement parmi les clones identifiés. Si l'un d'entre eux peut compléter un mutant (par transgénie restituant le phénotype sauvage par exemple), c'est qu'il s'agit de la séquence recherchée.

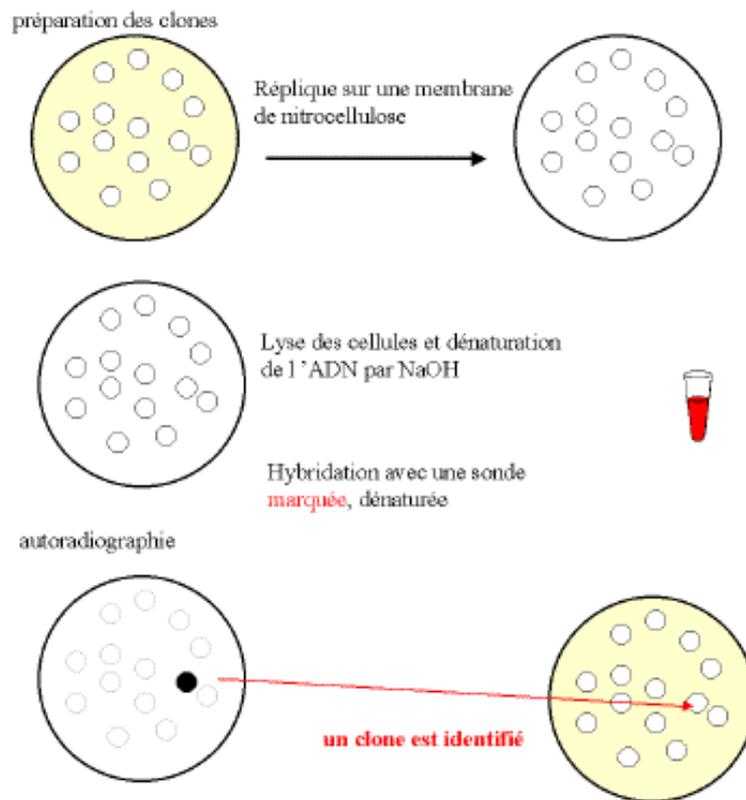


Figure 25 : Criblage par hybridation de l'ADN des clones transformés avec une sonde spécifique.

6. Amplification et sélection d'acides nucléiques particuliers (PCR)

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.

6.1. 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 10^5 à 10^6 . Les résultats doivent être optimisés en fonction d'un certain nombre de paramètres : concentration en $MgCl_2$, 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' à 3', mais elle est dénuée d'activité exonucléasique 3' à 5', 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 10^4 à 10^5 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.

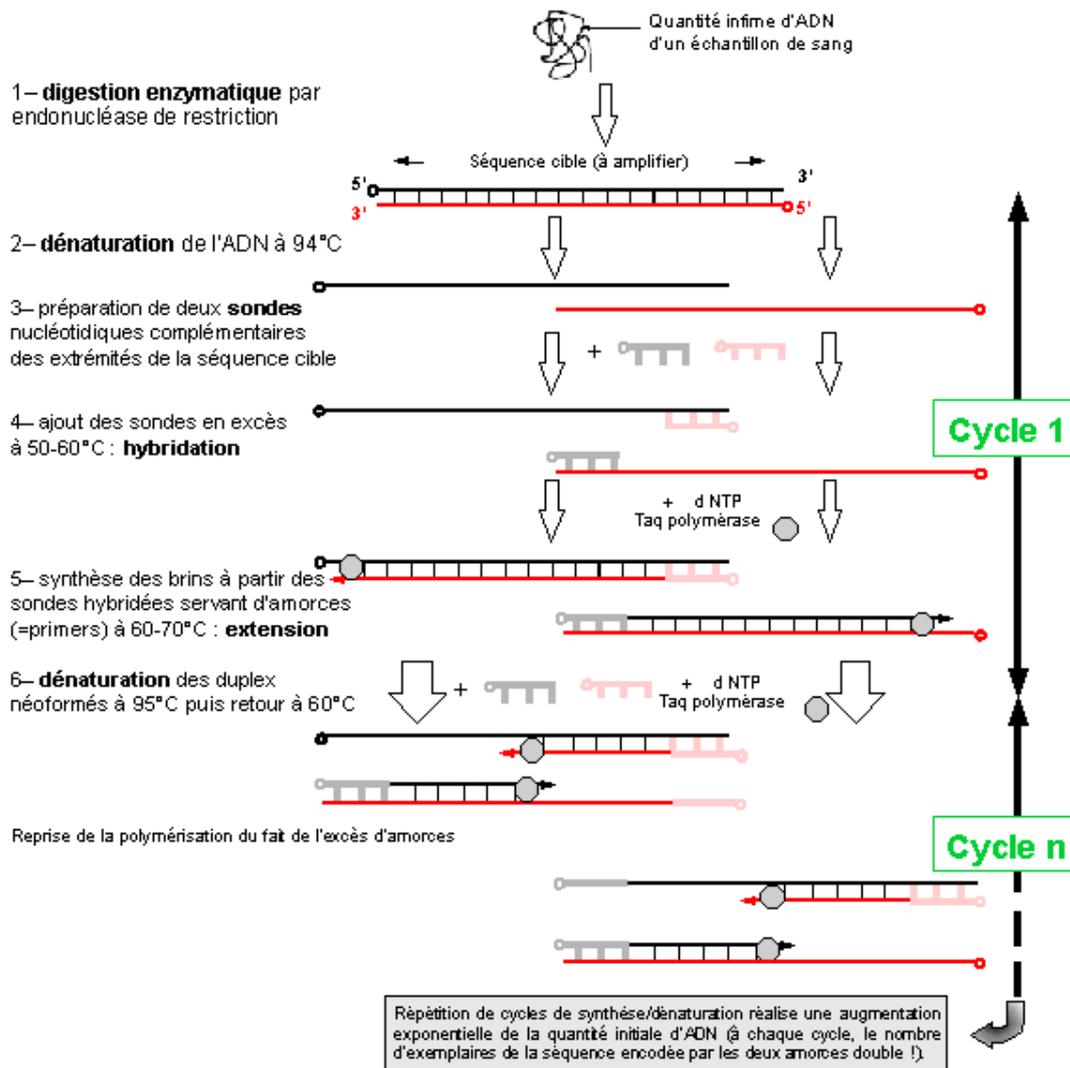


Figure 26 : Les étapes de la technique de PCR.

6.2. Utilisations des produits PCR :

Les utilisations des produits PCR sont très variées, nous citerons quelques exemples (cette liste n'est pas exhaustive) :

-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).

A titre d'exemple, la mutation ponctuelle (GAGàGTG) sur le sixième codon du premier exon du gène β de la globine humaine entraîne l'apparition d'une hémoglobine anormale appelée hémoglobine S (mutation ponctuelle d'un acide aminé : GluàVal). Cette anomalie est répandue dans le monde entier. Elle est responsable à l'état homozygote d'une pathologie grave : la drépanocytose homozygote. Cette mutation entraîne une modification du site de restriction de l'enzyme Dde I : C / TNAG (N = A, T, C ou G).

La mutation Hb S conduit à une mutation ponctuelle au niveau du codon 6 avec disparition du site de restriction pour l'enzyme Dde I :

L'électrophorèse des produits PCR après digestion par l'enzyme Dde I permet d'affirmer ou d'infirmer la présence d'une mutation GAGàGTG sur le codon 6 par la comparaison des tailles des fragments. On peut donc confirmer l'état hétérozygote ou l'état homozygote pour cette mutation.

-Introduction du produit PCR dans un vecteur : [clonage](#) du produit PCR.

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

-Analyse électrophorétique des produits PCR : technique DGGE et technique SSCP.

Ces techniques d'analyse électrophorétiques des produits PCR sont particulièrement utiles pour mettre en évidence des mutations ponctuelles au niveau d'un gène. Des produits PCR (ou amplimères) particuliers sont formés si des mutations sont présentes sur l'ADN initial. Les produits PCR seront différents en fonction de la présence d'une séquence normale, d'une séquence mutée (homozygote, hétérozygote ou composite) (voir schémas).

Technique DGGE (pour « denaturing gel gradient electrophoresis »).

La température de fusion d'un produit PCR (ADN double brin), c'est-à-dire la température moyenne de séparation des deux brins est fonction de sa séquence. Une mutation ponctuelle qui change donc la séquence entraîne une modification de la température de fusion. Cette modification est mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'un gradient d'agent dénaturant.

Technique SSCP (pour « single strand chain polymorphism »). La technique SSCP est basée sur l'analyse électrophorétique des produits PCR sous forme de fragments simple brin. On amplifie

par PCR une région que l'on désire étudier et on compare la mobilité de l'ADN dénaturé portant une mutation par rapport à celle d'un fragment de référence comportant une séquence normale. Une mutation ponctuelle au sein d'une séquence modifie suffisamment la structure secondaire de l'ADN monobrin pour qu'il en résulte des changements de migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide.

Les techniques DGGE et SSCP sont concurrencées par des techniques de chromatographie liquide à haute performance avec des températures d'élution variables (DHPLC : « denaturing high pressure liquid chromatography »).

RT-PCR

La RT-PCR se déroule en deux phases. Une première phase correspond à la copie d'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur le ADNc synthétisé.

Dans la première phase, l'ARN messager à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul mARN auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme de ADNc simple brin), une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension.

L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique. La technique RT-PCR a permis de montrer que la transcription de tous les gènes s'effectuait dans tous les tissus et ceci même pour les gènes qui présentent une très grande spécificité tissulaire. On parle dans ces conditions de transcription illégitime. Il est évident qu'avant les techniques d'amplification génique, la sensibilité des méthodes classiques n'avait pas permis de mettre en évidence un tel phénomène.

6.3. Séquençage

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci. Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, comme, par exemple, le diagnostic, les études génétiques, l'étude de paternité, la criminologie, la compréhension de mécanismes physiopathologiques, la synthèse de médicaments, les enquêtes épidémiologiques (Lamoril et al, 2008). Le principe du séquençage consiste à synthétiser un fragment de l'ADN que l'on

souhaite séquencer à partir d'une sonde-amorce dont une extrémité est marquée et à interrompre de façon aléatoire cette synthèse au moyen de ddTTP, ddATP, ddCTP et ddGTP marqués. Des simples électrophorèses permettront de lire la séquence comme indiqué. La méthode est automatisée, elle permet des recoupements et des alignements de séquence. Les résultats en sont généralement rendus sous forme de courbes de couleur différentes, chaque courbe correspondant à une base (figure 27).

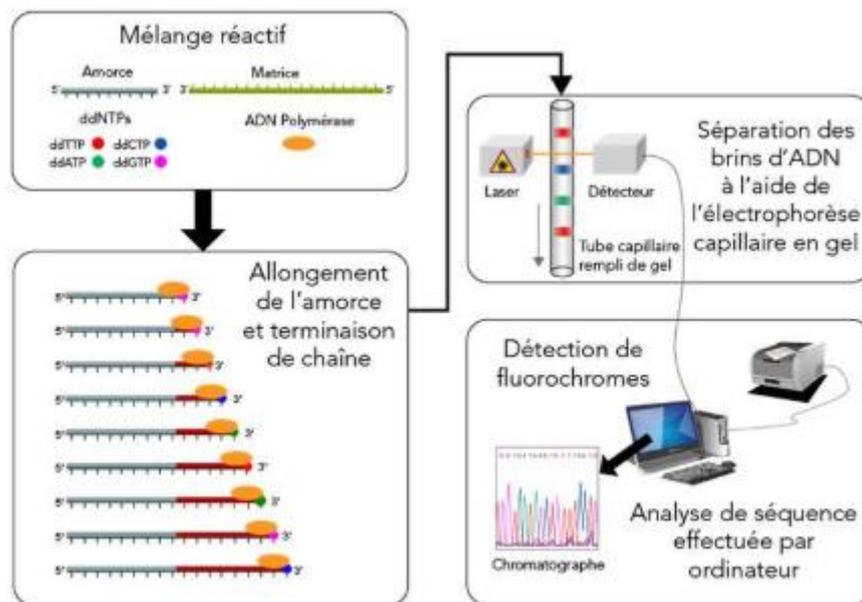


Figure 27 : Technique de séquençage.

L'application de séquençage est impliquée par le NGS (next-generation sequencing) qui est utile au diagnostic des maladies d'origine génétique. Selon la pathologie ciblée, il est possible de séquencer un groupe de gènes précédemment identifiés (maladies épileptiques héréditaires par exemple), l'exome (l'ensemble des exons) ou bien le génome entier (Adams, 2018). Le reséquençage des génomes humains permet d'étudier l'impact des polymorphismes génétiques sur la santé à l'échelle des populations ou sur la réponse immunitaire à l'échelle cellulaire (projet Human Functional Genomics) (Li *et al*, 2016). Le NGS constitue enfin la pierre angulaire de la métagénomique appliquée à la clinique (séquençage des micro-organismes présents dans un échantillon biologique dans un but diagnostique) ou l'étude des microbiotes (écosystème des micro-organismes qui colonisent différents compartiments de l'organisme) et est en passe de révolutionner la microbiologie.

Chapitre 6. Transfert de l'ADN dans les cellules.

1. Transfert direct

1.1 Biolistique : Ce procédé consiste en l'utilisation d'un pistolet modifié pour projeter de petites particules de métal (1 à 4 μm) dans des cellules de plantes à une vitesse suffisante pour traverser la paroi cellulaire. Un appareil utilisant une décharge électrique s'est révélé particulièrement utile au développement de méthodes de transfert de gènes non spécifiques d'une variété particulière dans le cas des céréales et des légumineuses les plus récalcitrantes.

1.2 Micro-injection : La micro-injection de gènes dans le noyau des cellules est la méthode la plus efficace. Elle peut conduire à l'obtention de 20% de cellules dans lesquelles le gène étranger est intégré. Elle nécessite un appareillage particulier et n'est justifiée que pour obtenir des clones stables de cellules pour lesquelles la transfection est difficile.

2. Transformation/transfection

2.1 Méthodes chimiques : au chlorure de calcium (bactéries) La transformation d'E. coli est une étape essentielle de nombreuses expériences de clonage. Les cellules d'E. coli et l'ADN plasmidique interagissent de façon productive en présence d'ions calcium et à basse température. Le protocole consiste à resuspendre des cellules en croissance exponentielle dans une solution glacée de chlorure de calcium (CaCl_2) 50 mM, à une concentration finale de 1010 cellules/ml, puis de les laisser à 0°C pendant 30 mn. L'ADN plasmidique (0,1 μg) est ensuite ajouté à un petit échantillon (0,2 ml) de ces cellules qui sont désormais compétentes pour la transformation et l'incubation dans la glace est poursuivie pendant 30 mn, puis suivie d'un choc thermique de 2 mn à 42°C. Les cellules sont transférées dans un milieu nutritif et incubées à température ambiante (de 30 mn à 1h) (Figure 28) pour permettre l'expression phénotypique des propriétés conférées par le plasmide, par exemple la résistance à antibiotique qui est souvent utilisé comme marqueur de sélection des cellules contenant un plasmide.

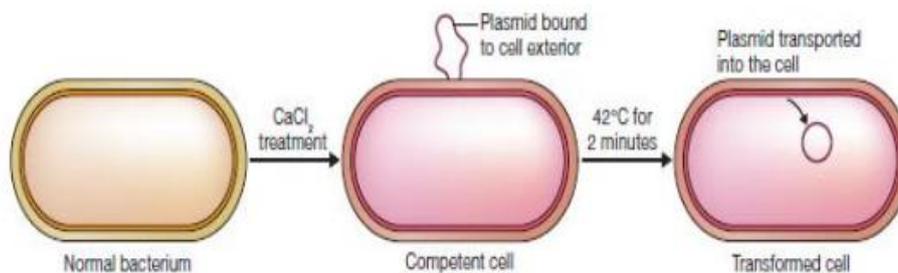


Figure 28 : Absorption d'ADN plasmidique par une cellule bactérienne compétente.

2.2 Co-précipitation de l'ADN et du phosphate de calcium

Le transfert réussi d'ADN dépendait de la formation d'une fin co-précipité ADN/phosphate de calcium, qui se dépose d'abord sur les cellules avant d'être internalisé. Ce précipité doit être préparé juste avant la transfection. Les petits grains de phosphate de calcium associés à l'ADN entrent par endocytose puis sont transportés vers le noyau, où certains ADN sont préservés et peuvent s'exprimer. Cette méthode ne s'applique qu'aux cellules qui poussent en monocouche, à l'exclusion de cellules en suspension ou formant des agrégats.

2.3 DEAE-dextran (Di-Ethyl-Amino Ethyl-dextran)

Le DEAE dextrane est un polycation qui facilite l'absorption de l'ADN sur la membrane plasmique et favorise son entrée à l'intérieur des cellules. Cependant le DEAE dextrane peut être toxique pour les cellules. L'optimisation des conditions de transfection est fonction de la sensibilité des cellules hôtes à ce polymère. Néanmoins, l'efficacité de transfection est élevée puisqu'on peut obtenir jusqu'à 25% de cellules transfectées.

2.4 Polycation-DMSO (cellules eucaryotes) :

Le DMSO (diméthyl sulfoxyde) est un solvant polaire organique, il augmente la perméabilité de la membrane et améliore l'adsorption et l'internalisation à la surface de la cellule.

2.5 Fusion des protoplastes Les protoplastes sont des cellules dont les parois celluliques ont été retirées. Ils sont très utiles pour la manipulation génétique pour deux raisons : premièrement, plusieurs protocoles de transformation ont été développés qui fonctionnent spécifiquement avec des protoplastes; et deuxièmement, parce que dans certaines conditions, des protoplastes de types cellulaires similaires ou contrastés peuvent être fusionnés pour donner des hybrides somatiques, un processus connu sous le nom de fusion de protoplastes.

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère qui provoque des fusions entre membranes plasmiques. Il permet le rapprochement physique des molécules d'ADN et du plasmalemma, et des déstabilisations locales et réversibles de la membrane plasmique. Il en résulte la pénétration de molécules d'ADN dans le cytoplasme des protoplastes.

2.6 Lipofection

L'utilisation de liposomes comme système de transformation ou de transfection est appelée lipofection. C'est une technique utilisée pour injecter du matériel génétique dans une cellule au moyen de liposomes, qui sont des vésicules qui peuvent facilement se confondre avec la membrane cellulaire puisqu'elles sont toutes deux constituées d'une bicouche phospholipidique. La lipofection utilise généralement un lipide chargé positivement (cationique) pour former un

agrégat avec le matériel génétique chargé négativement (anionique). Les complexes moléculaires obtenus, appelés lipoplexes, sont ensuite repris par les cellules. Les principaux avantages de la lipofection sont : son efficacité élevée, sa capacité à transférer tous les types d'acides nucléiques dans un large éventail de types de cellules, sa facilité d'utilisation, sa reproductibilité et sa faible toxicité.

2.7 Peptides

Les peptides ont été principalement utilisés comme agents auxiliaires pour d'autres systèmes de vectorisation, en particulier des polymères cationiques tels que la polylysine, auxquels ils peuvent apporter une fonction de ciblage cellulaire, une activité de type membranolytique ou encore un signal de localisation nucléaire. L'entrée se fait par endocytose, le composé doit pouvoir déstabiliser la membrane endosomale avant que l'ADN ne soit dégradé dans le lysosome. Une fois relargué dans le cytosol, l'ADN peut pénétrer dans le noyau au cours de la division cellulaire.

2.8 Electroporation L'électroporation est une méthode simple pour introduire des gènes clonés dans des cellules très diverses. La technique consiste à utiliser des décharges électriques de haute tension qui induisent les membranes cytoplasmiques à fusionner. Les cellules soumises à un choc électrique captent de l'ADN exogène présent dans la suspension. Une partie de ces cellules sont transformées de façon stable et peuvent être sélectionnées si l'ADN transformant porte un marqueur approprié.

2.9 Transduction virale (encapsulation *in vitro*) La transduction est le troisième mode de transfert génétique chez les bactéries. La transduction est un processus qui consiste en un transfert de matériel génétique (ADN bactérien), d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse, par l'intermédiaire d'un vecteur viral (un bactériophage). Le bactériophage infecte une première bactérie (bactérie donneuse) et y injecte son ADN viral à travers la paroi de la cellule. De nouveaux phages s'y développent, et certains intègrent une partie du génome bactérien dans leur capsid de phage. Lors de la libération des phages, ceux-ci vont infecter d'autres bactéries. Les virus comportant une partie d'ADN bactérien vont l'injecter dans une nouvelle bactérie (bactérie receveuse).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- *Adams, D & Eng, C. (2018). Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. *New England Journal of Medicine*. 379(14): 1353-1362.
- *Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K & Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*, 3rd. Garland Publishing Inc., New-York.
- *Ameziane, N., Marc, B., Jérôme, L. (2005). *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*.
- *Bernard, Swynghdauw. (1994). *Biologie moléculaire. Principes et méthodes*.
- *Brown, T.A. (2010). *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. 6 th Ed, WileyBlackwell. University of Manchester, London, 376 p.
- * Cseke, L., Dudareva, N. & Pichersky E. (1998). Structure and evolution of linalool synthase – *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1491-1498
- *De Donald, V & Judith, G.V. (2011). *Biochimie. De Boeck Superieur*. Paris. 3ème édition
- * Denis, T., Stéphanie, J & Agnès, M. (2018). *Principes des techniques de biologie moléculaire ; Collection Savoir faire*.
- *Houdebine, L.M. & Weill, B. (1999). The impact of transgenesis and cloning on cell and organ xenotransplantation to humans. *ECS 9 Brussels. Focus on Biotechnology*, 351-361.
- *Houdebine L.M. (2003). In: Tagu D. & Moussard C. (2003). *Principes des techniques de biologie moléculaire*. 2 ème édition INRA, Paris. pp. 109.
- *Jacob, F. (1976). *La Logique du Vivant*. Paris.
- *Kaplan, J.C & Delpech, M. (1993). *Biologie moléculaire et médecine*.
- *Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.C., Bouizegarène, P & Bogard, M. (2002). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-Analyse et Biologie Spécialisée*. 23(5) :260-279.
- *Li, Y., Oosting, M., Deelen, P., Ricaño-Ponce, I., Smekens, S., Jaeger & Netea, M. (2016). Inter-individual variability and genetic influences on cytokine responses to bacteria and fungi. *Nature Medicine*. 22(8):952-960.
- * Miller, S.A. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 16, 1215.
- *Lionnet, T & Croquette, V. (2005). *Introduction à la Biologie Moléculaire*.
- *Morange, M. (1994). *Histoire de la Biologie Moléculaire*. Paris.
- * Orratia, E & Chang, P.L. (1990). Intracellular distribution of DNA internalized through calcium phosphate precipitation. *Exp. Cell Res*. 190 : 170-4.
- * Pendleton, K, M., Erb-Downward, J., Bao, Y., Branton, W., Falkowski, N., Newton, D & Dickson, R. (2017). Rapid Pathogen Identification in Bacterial Pneumonia Using Real-Time Metagenomics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 196(12): 1610-1612.
- * Primrose, S.B & Twyman, R.M. (2006). *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. Seventh edition Blackwell Publishing. 672 p.
- *Primrose, S., Twyman, R. & Old, R. (2004). *Génie génétique*. 1 ère Edition De Boeck, Bruxelles, 400 p.
- * Ruppé, É., Lisboa, T & Barbier, F. (2018). The gut microbiota of critically ill patients: first steps in an unexplored world. *Intensive Care Medicine*. 44: 1561-1564.
- *Schrödinger, E. (1993). *Qu'est-ce que la vie ?* Paris.
- * Tagu, D & Moussard, C. (2003). *Principes des techniques de biologie moléculaire*. 2 ème édition INRA, Paris. 176 p.
- *Voet, D. and J.D. Voet. (1995). *Biochemistry*, 3rd. New York.
- *Wagner, E.G., Heijne, J.v. & Nordström, K. (1987). Control of replication of plasmid R1: translation of the 7k reading frame in the RepA mRNA leader region counteracts the interaction between CopA RNA and CopT RNA. *EMBO J*, 6, 515- 522.