

Cours 7 : Techniques d'étude de l'ADN

Depuis la découverte de la nature du gène grâce aux progrès de la biologie moléculaire, les techniques d'étude de l'ADN se sont constamment développées.

Plusieurs domaines ont contribué à l'étude de l'ADN:

- l'instrumentation et les techniques
- les sondes radioactives et fluorescentes
- l'enzymologie des acides nucléiques
- La bioinformatique.

1. Marquages

1.1 Marquages radioactifs

Des éléments radioactifs ont été les premiers utilisés en tant que sondes extrêmement sensibles pour détecter des quantités minimes de macromolécules spécifiques. Le marquage de l'ADN par des radionucléides permet de localiser sa présence grâce à l'autoradiographie. Exp : La thymidine marquée radioactivement peut être employée pour différencier l'ADN ou l'ARN. Le tritium (^3H) est un isotope radioactif de l'hydrogène qui marque la thymidine. Le nucléotide est appelé la thymidine tritiée

Un isotope radioactif de phosphore (^{32}P) a été largement utilisé

Néanmoins, la découverte de molécules fluorescentes ont conduit à remplacer beaucoup de traceurs radioactifs par ces molécules fluo. Elles sont plus simple à employer, meilleures pour l'environnement et plus facilement dégradables.

1.2 Marqueurs fluorescent

Les molécules fluorescentes sont de plus en plus utilisées en biologie. Ces molécules contiennent un fluorophore qui absorbe et émet de la lumière à des longueurs d'onde qui lui sont caractéristiques. Cette lumière émise peut être détectée et enregistrée par un certain nombre d'instruments de mesure (microscopes, spectrophotomètres...). Des sondes fluorescentes peuvent être attachées à une variété de molécules biologiques afin de les détecter et de les étudier. Pendant les réactions de séquençage d'ADN, chaque nucléotide est marqué avec une molécule fluorescente différente.

2. Enzymologie des acides nucléiques

Les nucléases sont des enzymes qui hydrolysent ou cassent les liaisons phosphodiester. On distingue.

- Les exonucléases: enlèvent les nucléotides terminaux un par un.
- Les endonucléases: cassent les liaisons sucre-phosphate aux sites non terminaux.
- La ribonucléase (RNase) dégrade les ARN.
- Les endonucléases de restriction cassent l'ADN au niveau de séquences spécifiques: les sites de restriction.
- Les endonucléases II sont les plus utilisées (palindrome).

3. Technologie de l'ADN recombinant

Les fragments d'ADN obtenus par coupure aux enzymes de restriction sont liés à des vecteurs d'ADN pour former des molécules d'ADN recombinant

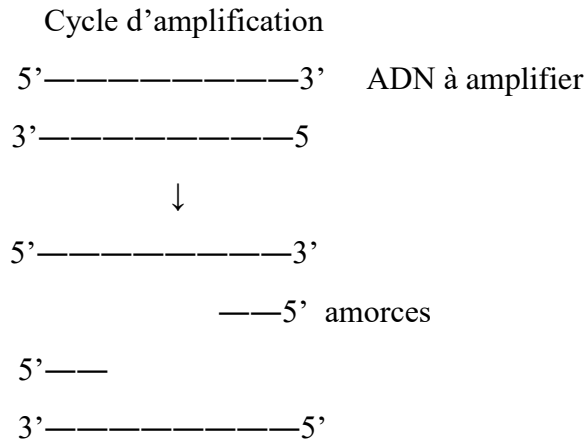
Les vecteurs se répliquent de façon autonome dans les cellules hôtes et facilitent la manipulation des molécules d'ADN recombinant nouvellement créées. Les vecteurs sont construits à partir des différentes sources comme les plasmides bactériens et les phages

Les molécules d'ADN recombinant sont transférées chez un hôte et des copies clonales sont produites au cours de la réplication de la cellule hôte. Un grand nombre de cellules hôtes peuvent être utilisées pour la réplication, comme les bactéries, la levure et les cellules humaines. Les copies clonales de séquences d'ADN étranger sont récupérées, purifiées et analysées

4. La PCR

- La réaction de polymérisation en chaîne est une méthode d'amplification spécifique d'une séquence d'ADN (ADN génomique, de reste momifié, fossiles, échantillons médico-légaux).
- La PCR permet de cloner de l'ADN sans utiliser de cellules hôtes: elle constitue une méthode de clonage rapide et sensible avec un large éventail d'applications
- Elle est apparue en 1986 (prix Nobel de chimie en 1993 à Kary Mullis)
- L'ADN à cloner est dénaturé en simple-brin par chauffage à 90-95° pendant 5 mn

- Ensuite, la T° est baissée entre 42°C et 68°C pour permettre l'hybridation avec des amorces.
- Les amorces sont des oligonucléotides. Une pour chaque extrémité (3' et 5') de la séquence d'ADN qui sera amplifiée.



- Les amorces (15-20 nucléotides) servent de point de départ à la synthèse des nouveaux brins d'ADN complémentaires à l'ADN cible.
- La polymérase taq (thermorésistante) est ajoutée au mélange à des T° de 70 à 75°C pour allonger les amorces.
- C'est un cycle où le nombre de molécule d'ADN est doublé, il prend 5mn. En moins de 3h, la quantité de l'ADN peut être multipliée par plus de 100 millions.
- Ces séquences d'ADN peuvent être utilisées à des fins variées: diagnostic clinique, clonage dans des vecteurs plasmidiques.
- Le clonage par PCR a plusieurs avantages sur le clonage cellulaire: la PCR est rapide, la PCR est faite automatiquement. Elle peut être faite à partir de traces d'ADN
- Limites de la PCR:

Il est indispensable de connaître la séquence de nucléotides de l'ADN cible (du moins au niveau des amorces). Une contamination même mineure de l'échantillon par une autre source d'ADN peut fausser les résultats.

5. Technique FISH (hybridation in situ –milieu naturel- en fluorescence)

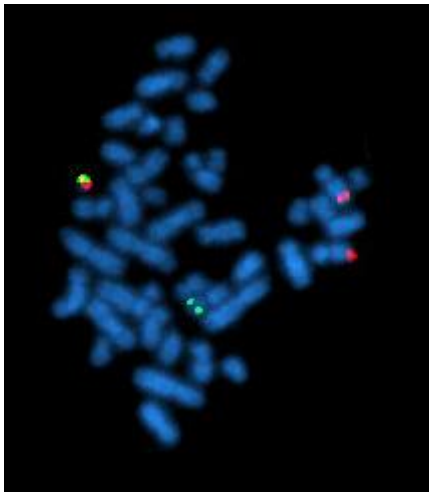
- La toute première technique de cytogénétique moléculaire s'appelle l'hybridation in situ fluorescente. Elle repose sur les propriétés de dénaturation et de renaturation de la molécule d'ADN.
- La FISH est une technique permettant de voir des éléments situés à l'intérieur même de la cellule. C'est une méthode très utilisée en médecine, en cytogénétique (caryotype), elle permet aussi l'étude de la biodiversité. Elle repose sur l'utilisation d'ADN marqué par un ou plusieurs fluorochromes qu'on appelle sonde.
- L'hybridation de la sonde est spécifique avec sa séquence cible, selon des conditions précises de température, de salinité et de pH.
- Le signal est ensuite observé à l'aide d'un microscope à fluorescence.
- Les fluorochromes sont des molécules capables d'être excitées (accumulation d'énergie) par une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) et de restituer une partie de cette énergie sous l'aspect d'une longueur d'onde de moindre énergie appelée longueur d'onde d'émission (λ_{em}).
- les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides.
- Les fluorochromes couramment utilisés sont :
 - le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (310nm – 372nm) se fixe sur les bases A et T de l'ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l'hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.
 - le FITC (Fluorescein isothiocyanate) (λ_{exc} 495nm – λ_{em} 519nm) fluoresce dans le vert s'attache aux groupements sulfhydriles des protéines.
 - La Cyanine 3 (Cy3) (λ_{exc} 495nm – λ_{em} 519nm) fluoresce dans l'orange
 - Le Texas red (λ_{exc} 589nm – λ_{em} 615nm) fluoresce dans le rouge
 - La Cyanine 5 (λ_{exc} 650nm – λ_{em} 670nm) fluoresce dans le rouge
 - La Cyanine 5.5 (λ_{exc} 675nm – λ_{em} 694nm) fluoresce dans le rouge

Les différentes sondes :

- Les sondes composées de séquences uniques: les sondes spécifiques de loci
- Les sondes spécifiques d'un bras chromosomique ou d'un chromosome entier.
- Sondes avec séquence répétée satellite.

L'hybridation :

- Cette opération consiste à mettre en présence la sonde avec l'ADN des chromosomes dénaturé.
- Le temps d'hybridation varie de 5mn à 48h
- Observation dans un microscope à fluorescence



6. Séquençage de l'ADN

- Séquençage par enzymes:

C'est une méthode très utilisée. Plusieurs variantes de cette méthode ont été développées, tous utilisent une ADN polymérase. L'ADN à séquencer est un amplicon (PCR) ou obtenu par clonage.

- 4 marquages fluorescents:

- Il faut préparer 4 mélanges:
 - le fragment qui doit être séquencé,
 - une amorce dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer,
 - les 4 dNTPs désoxyribonucléotides triphosphate (dCTP, dATP, dGTP, dTTP),
 - l'ADN polymérase,

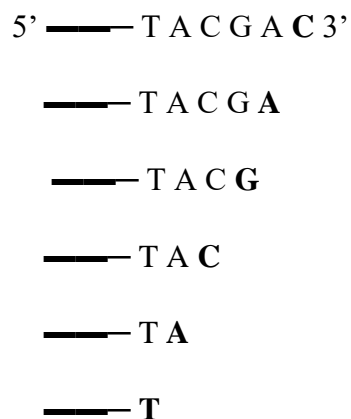
Dans chaque tube, de petites quantités de ddNTP fluorescent (de couleurs différentes), son incorporation aléatoire stoppant la synthèse (car au niveau du sucre, est trouvé un H à la place du OH de la position 3').

On obtient à la fin des réactions, un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddNTP se sera inséré et que la réaction aura ainsi été stoppée.

L'utilisation d'un ddNTP (didésoxyribonucléotides) permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacements d'un nucléotide donné.

NB synthèse du brin complémentaire, donc si arrêt par un ddGTP,

Un rapport approprié des ddNTPs par rapport aux dNTPS normaux est choisi de sorte que seulement une fraction relativement petite des produits croissants d'extension soit terminée par l'addition des ddNTPs.



- Ces réactions sont maintenant effectuées en utilisant un format de cycle de PCR dans un processus appelé cycle de séquence.

L'électrophorèse de gel de polyacrylamide est alors appliquée dans les conditions qui permettent la séparation des produits d'extension différents dans la longueur par un nucléotide simple dans une ligne (ou colonne) simple sur gel.

Le nucléotide est indiqué par le colorant fluorescent spécifique.

- Un gel de séquence peut donner 500-600 pb d'information de séquence par ligne.
- 50000 pb peuvent être séquencées dans environ 4 à 6 h.
- Le séquençage de grand génome est maintenant possible

7. Méthode de Séquençage de l'ADN par Frederick SANGER (1918-2013)

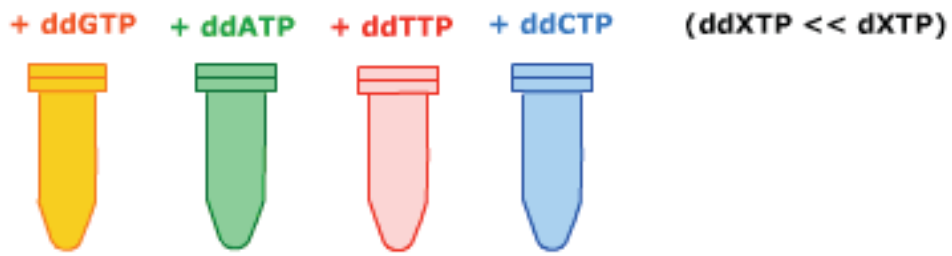
Un biochimiste anglais qui a reçu 2 prix Nobel de chimie:

- 1958 : structure des protéines (insuline)
- 1980 : pour le séquençage
- Les ADN polymérases sont capables de synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'un brin matrice.
- Pour le séquençage, des nucléotides légèrement différents sont utilisés : les **didésoxyribonucléotides (ddNTP)** au lieu des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP).
- Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'.
- Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

Il faut préparer 4 solutions contenant chacune:

- le fragment qui doit être séquencé
- un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer c'est l'amorce
- les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- l'ADN polymérase

Dans chaque tube, on met de petites quantités d'un ddNTP **fluorescent** ou **radioactif** (32P)



L'incorporation aléatoire d'un ddNTP stoppe la synthèse

On obtient donc à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddNTP se sera inséré.

