




Faculté des Sciences de la Nature, de la Vie et des Sciences de la Terre et de  
l'Univers

Département des Sciences Agronomiques

**Cours biologie moléculaire et génie  
génétique**

*Présentée par : M<sup>me</sup> BELLATRECHE. Aminâ*



# **1- Rappels sur les mécanismes génétiques fondamentaux et régulation de l'expression des gènes**

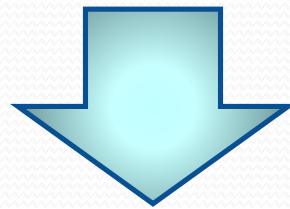
# STRUCTURE DE L'ADN

## Introduction à la génétique

La génétique ou science de l'hérédité, cherche une réponse aux trois questions suivantes :


- Quelle est la structure du matériel cellulaire support de l'hérédité ?
- Comment ce matériel est-il transmis d'une génération à la suivante ?
- Par quels processus sont assurés la manifestation des caractères d'un individu ?

La deuxième question « Comment ce matériel est-il transmis d'une génération à la suivante ? » a été envisagée en premier lieu et c'est à **G. Mendel** (1822-1884) qu'il faut attribuer le mérite d'y avoir répondu, vers 1865, en abordant le problème sous un angle méthodique et statistique (sur des végétaux)



*Les lois de Mendel*


- ❖ Vers 1900 après que **Weisman** en 1892 eut fait la distinction entre les cellules germinales (germen) et somatique (soma);
- ❖ Trois botanistes, **de Vries, Correns** et **Tschermak** redécouvrirent, indépendamment les uns des autres, les lois de Mendel;
- ❖ C'est à partir de ce moment qu'une science nouvelle, que **Bateson** appelle en 1906 la «génétique», prend son véritable essor.




■ Entre 1900 et 1910, **Cuénot** et Bateson  
entreprirent d'appliquer aux animaux les lois  
de l'hérédité découvertes par le moine  
autrichien.

La première question « **Quelle est la structure du matériel cellulaire support de l'hérédité ?** » a été ensuite donnée en plusieurs étapes:

- Entre 1910 et 1920, **T. H. Morgan** et ses collaborateurs ont d'abord donné un support morphologique aux facteurs héréditaires : **le chromosome.**
- Puis on s'est attaché à rechercher la nature biochimique de ces facteurs héréditaires ou gènes, selon le terme proposé en 1909 par **Johansen.**

 On connaissait l'ADN depuis longtemps et on savait que les chromosomes sont constitués principalement d'ADN. Ce n'est cependant qu'en 1944 qu'**Avery** et ses collaborateurs démontrèrent expérimentalement que l'ADN est bien le matériel génétique;

 En 1953, **Watson** et **Crick** (prix Nobel 1962) proposait la structure en double hélice de l'ADN.






■ La réponse à la première question était donnée :

un gène est une fraction de molécule d'ADN organisé  
de manière à donner un produit fonctionnel.

La troisième question, la plus complexe: « **Par quels processus sont assurés la manifestation des caractères d'un individu ?** » a été abordée en dernier lieu:

- 1940, deux biologistes américains, **G. Beadle** et **E. Tatum**, montrèrent la relation précise entre un gène et une enzyme cellulaire,
- 1960, **Nirenberg** et ses collaborateurs découvrirent comment se fait la transmission de l'information contenue dans un gène pour commander la synthèse d'une protéine spécifique découverte du **code génétique**.



■ La réponse globale à la troisième question a été donnée : le gène gouverne, par l'intermédiaire du code génétique, la synthèse des protéines, molécules qui constituent la substance même des cellules, donc des individus.

# ADN

ADN → Acide désoxyribonucléique



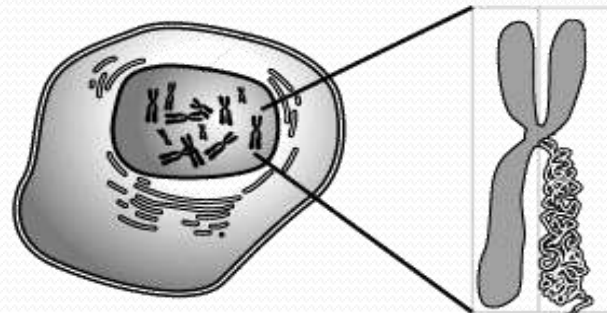
**Humain**

*Patrimoine*

*Génétique*

→ **Unique à  
chaque individu**

Constitué de



**Cellule**

**Chromosome**

Total = 46

23 paires

50% père

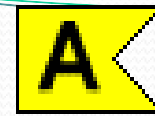
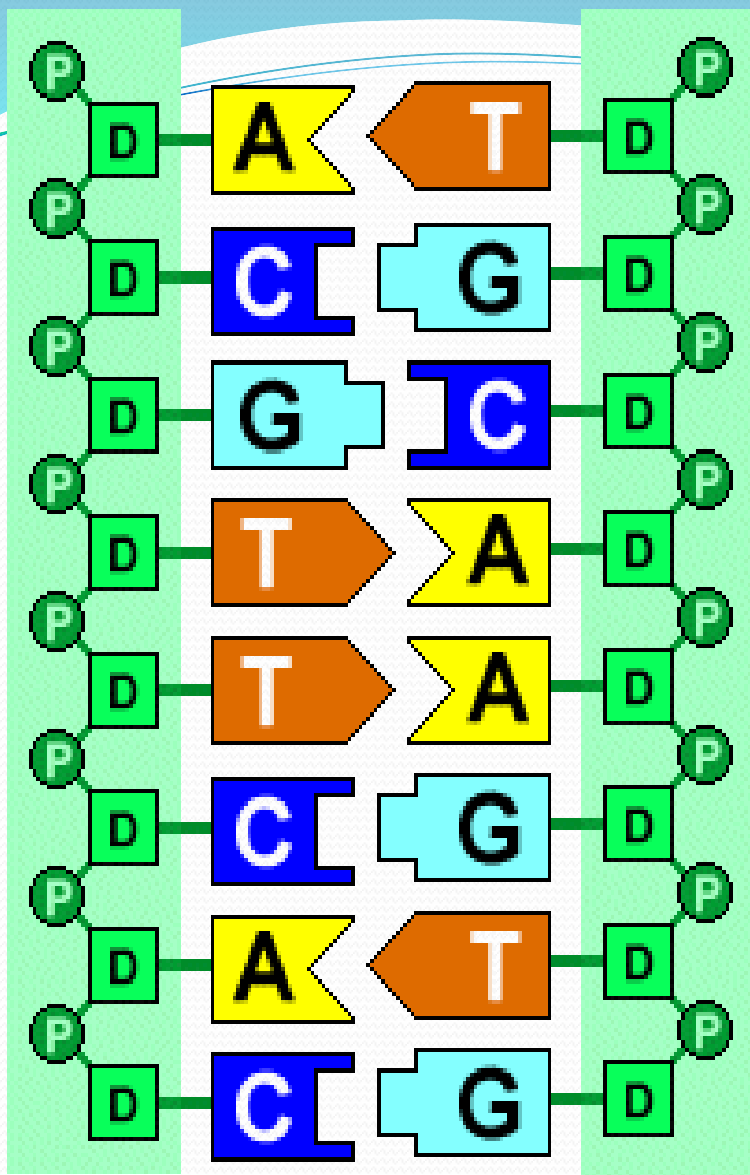
50% mère



L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule que l'on retrouve dans tous les organismes vivants → le support de l'information génétique.

L'ADN est présent dans le noyau des cellules eucaryotes, dans le cytoplasme des cellules procaryotes, dans la matrice des mitochondries ainsi que dans les chloroplastes.

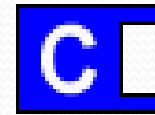
Certains virus possèdent également de l'ADN encapsulé dans leur capsid.



adénine



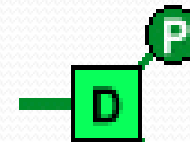
thymine



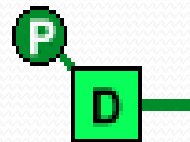
cytosine



guanine



acide phosphorique  
désoxyribose



nucléotide

montant

barreau

montant

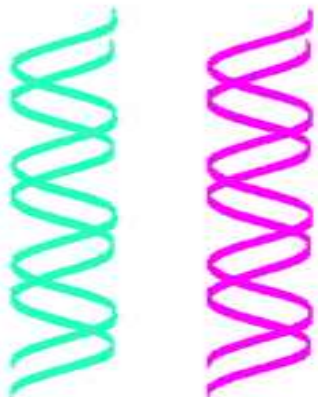
# Réplication de l'ADN

**Pourquoi ?**

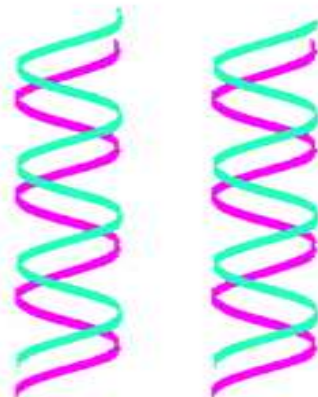
**La réplication de l'ADN**

# Quel est le mode de réplification de l'ADN ?

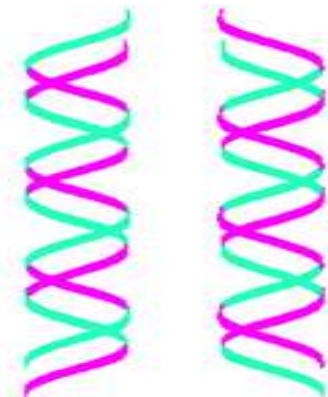
**Conservatif**



**Semi-conservatif**



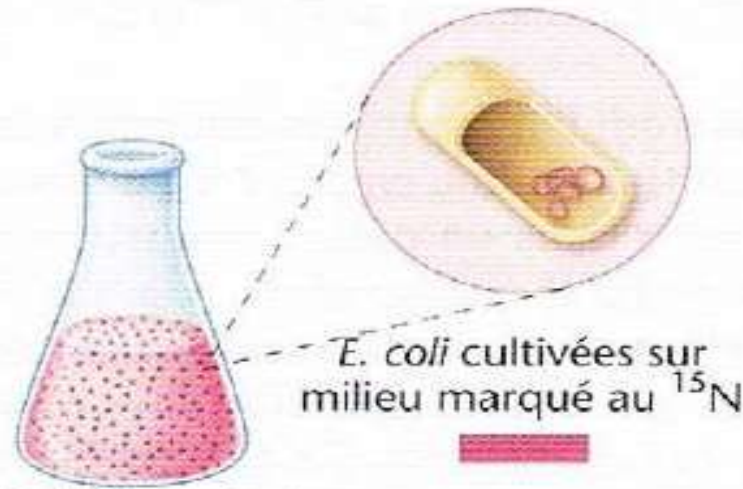
**Dispersif**



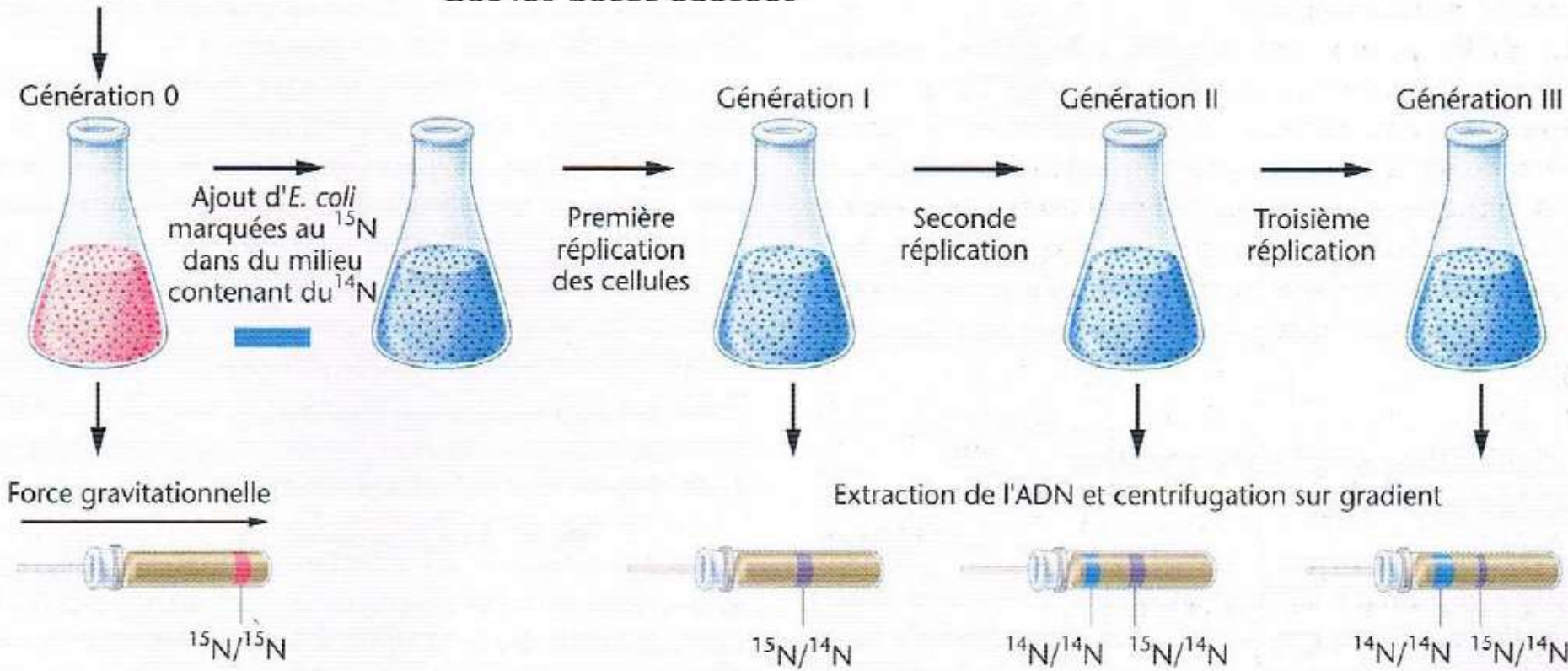
**Un cycle réplcatif - les brins néosynthétisés sont en bleu**



# L'expérience de Meselson et Stahl



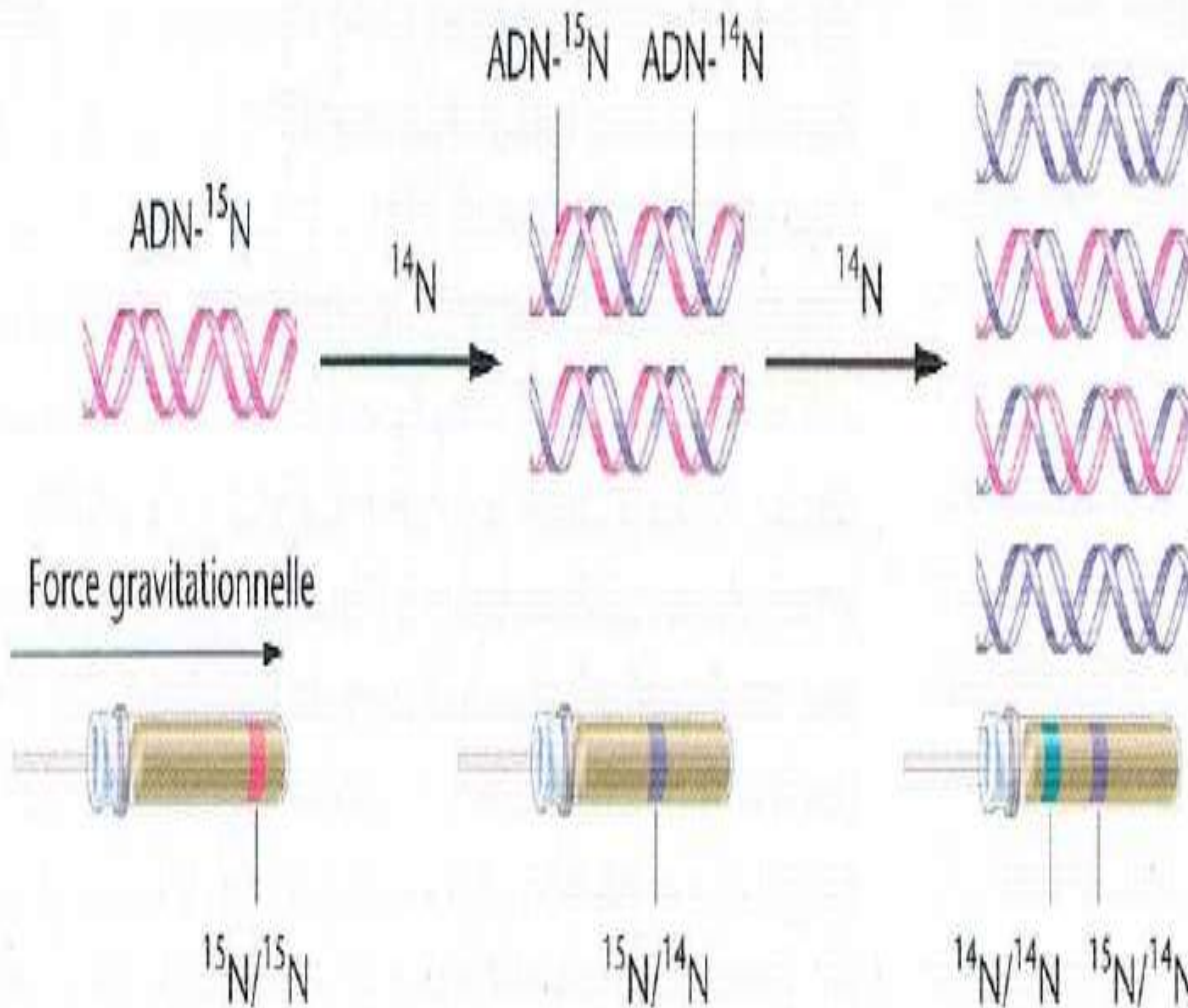
L'ADN d'*E. coli* devient marqué uniformément



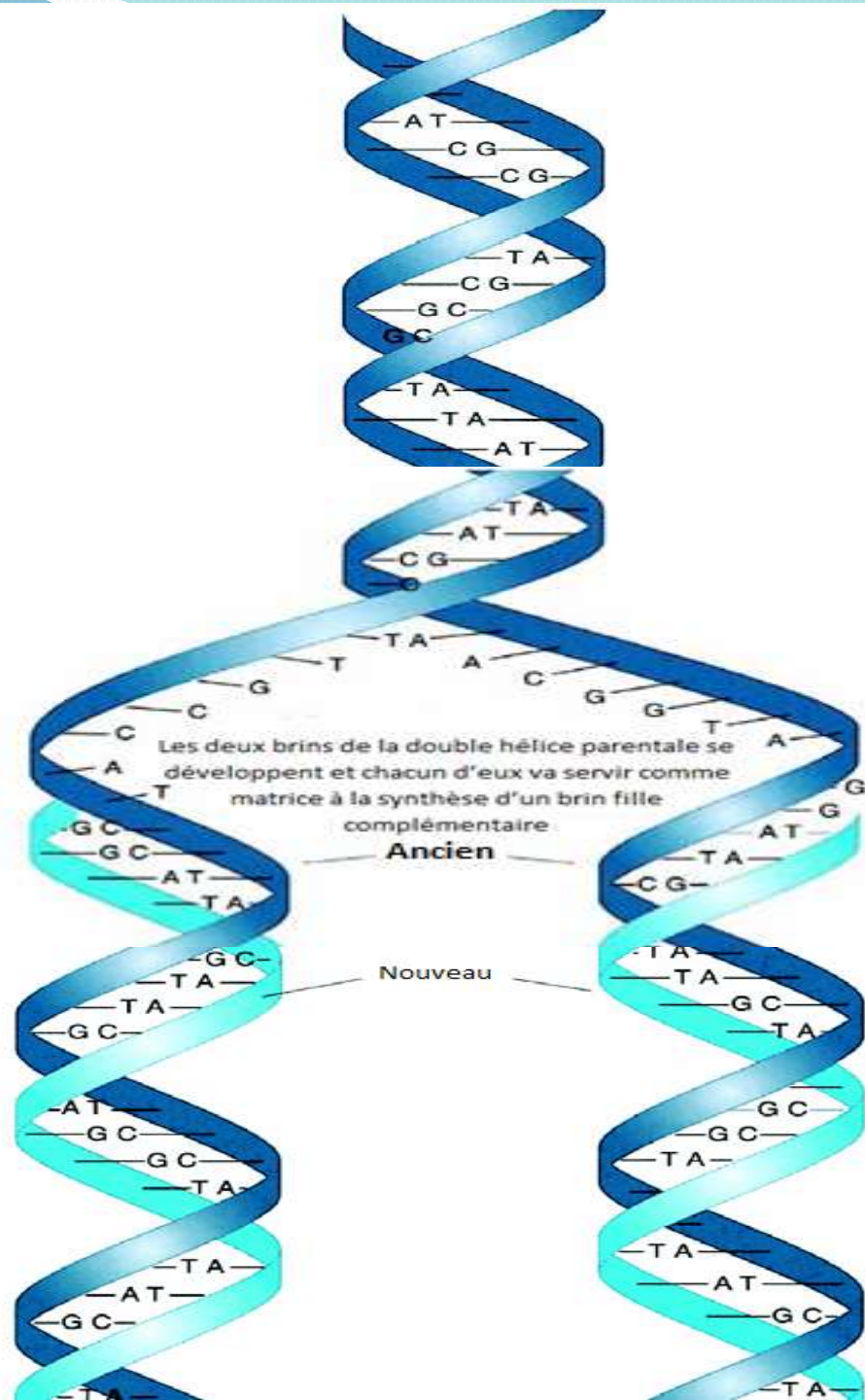
Génération I

Génération II

FIGURE 11.4 Résultats attendus dans l'expérience de Meselson-Stahl après deux générations de réplication semi-conservative.



**Conclusion  
: L'ADN se  
réplique  
selon le  
mode semi-  
conservatif**

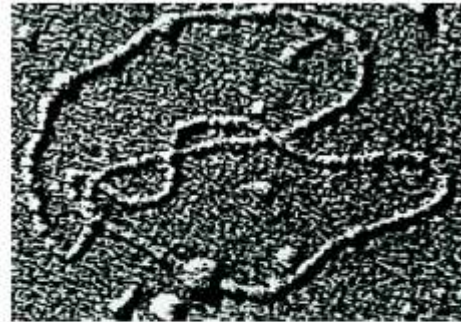
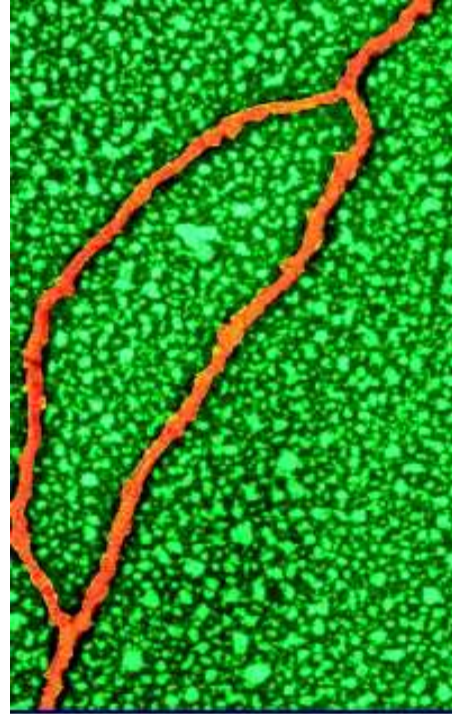
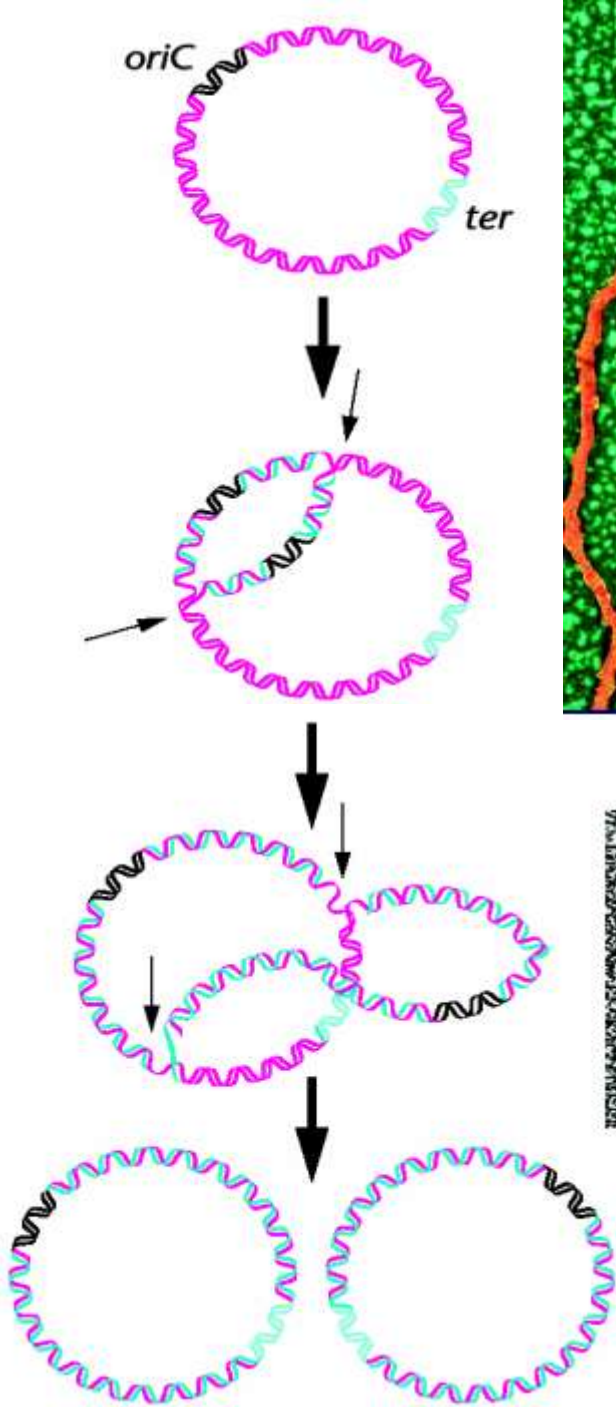


# Mécanisme de réplication de l'ADN

## 1. Chez les Bactéries (Procaryotes)

Il y a qu'une seule origine de réplication (*oriC*) chez les bactéries.

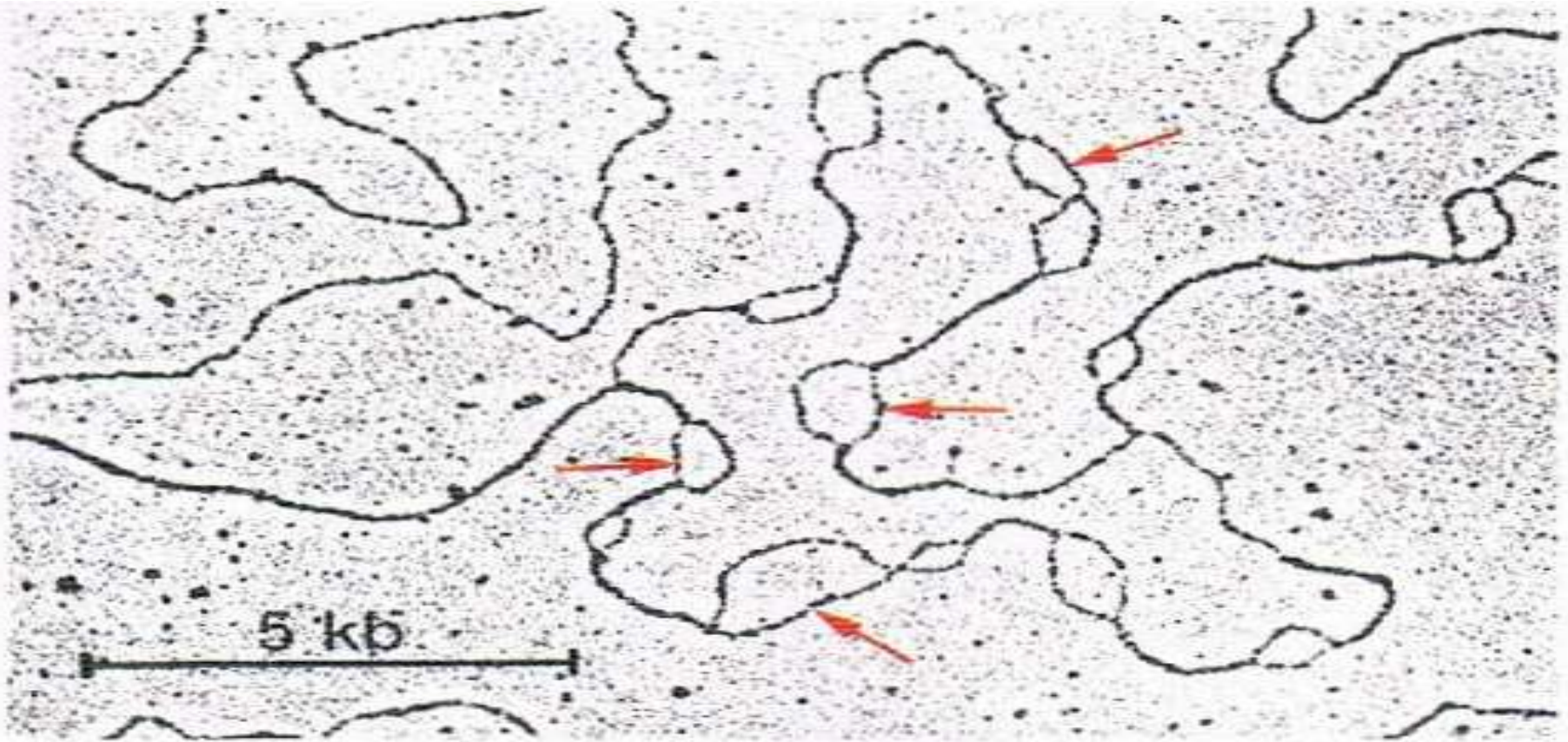
Chez les procaryotes et eucaryotes, la réplication est bidirectionnelle: les 2 fourches formées migrent dans des directions opposées en s'éloignant de l'origine de réplication



**FIGURE 11.6** Réplication bidirectionnelle du chromosome d'*E. coli*. Les flèches fines indiquent la progression des fourches de réplication. La microphotographie montre un chromosome bactérien lors de sa réplication. Ce chromosome est comparable à celui schématisé sur la figure adjacente.

## 2. Chez les eucaryotes

Existence de plusieurs origines de réplication (flèches rouges)



**FIGURE 11.14** Démonstration des origines multiples de réplication le long d'un chromosome eucaryote. Chaque origine apparaît sous forme d'une boucle de réplication le long de l'axe du chromosome. Des flèches indiquent certaines de ces bulles de réplication.

**La synthèse ou réplication de l'ADN nécessite des activités enzymatiques (ADN polymérase)**



**Chez les procaryotes**

**ADN polymérase I, II et III Bactérien**

**Chez les Eucaryotes**

**AND polymérase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\gamma$  et  $\zeta$ .**

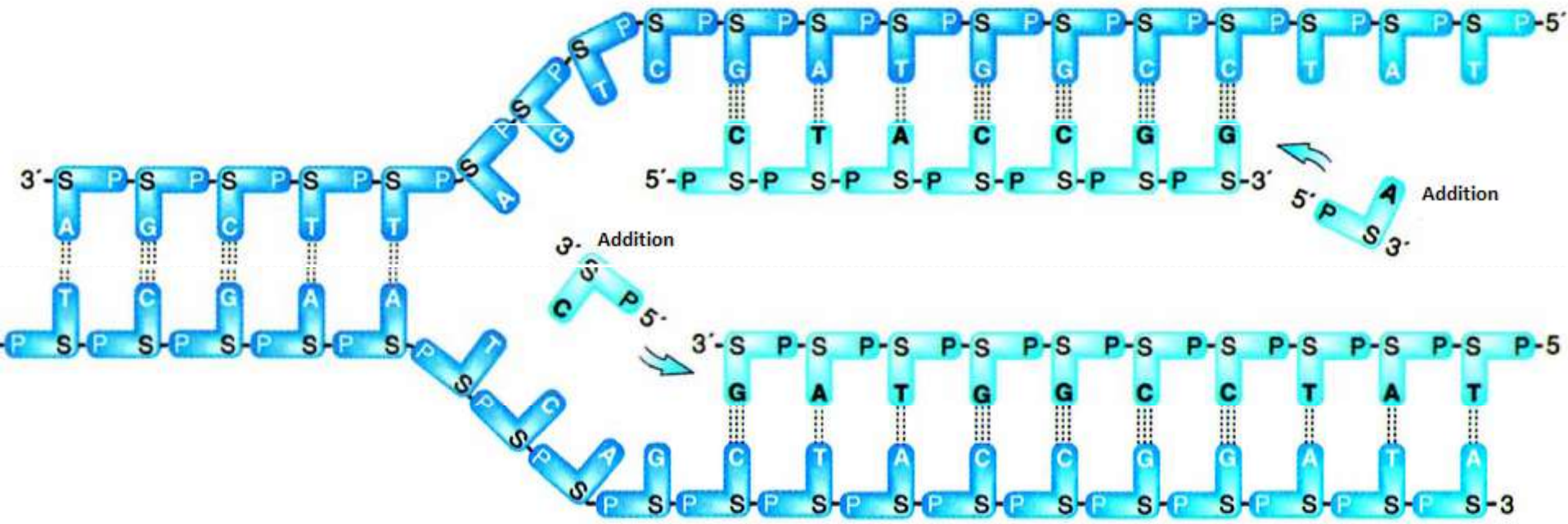
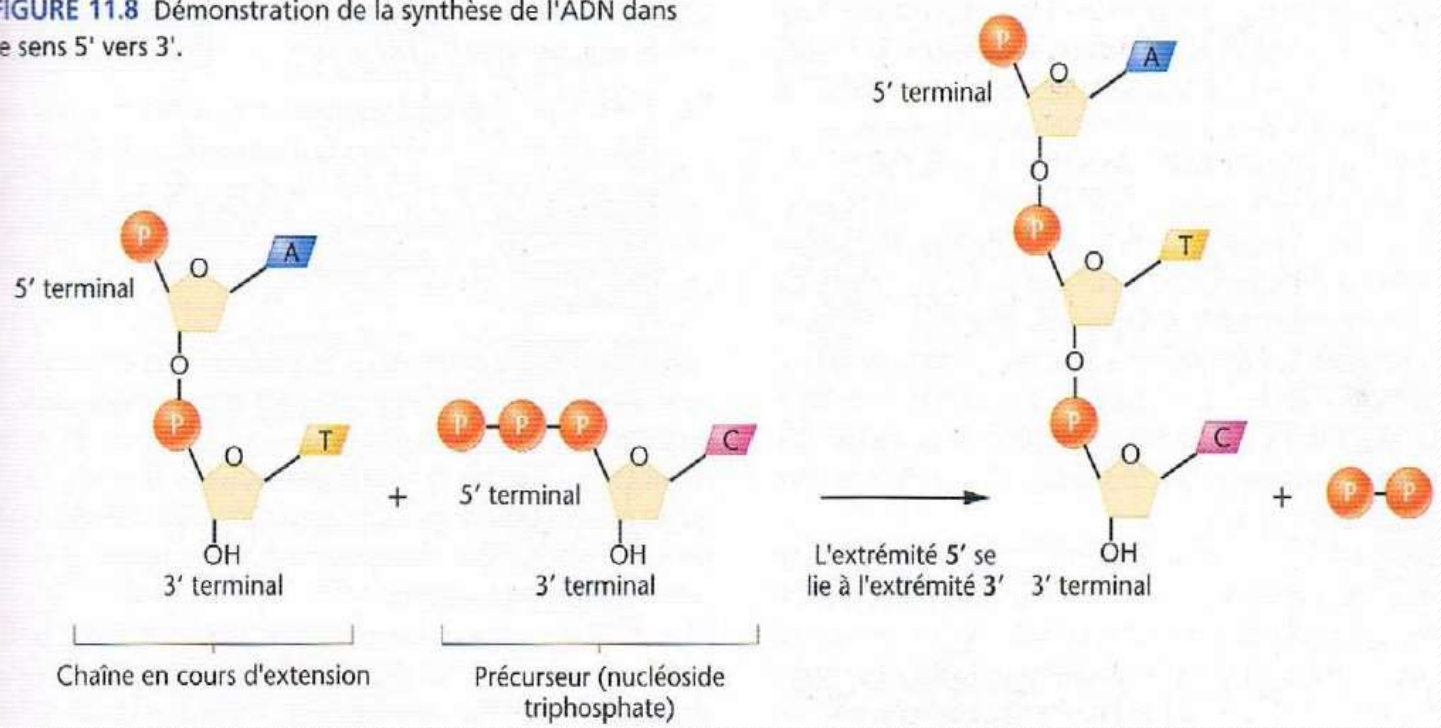



FIGURE 11.8 Démonstration de la synthèse de l'ADN dans le sens 5' vers 3'.

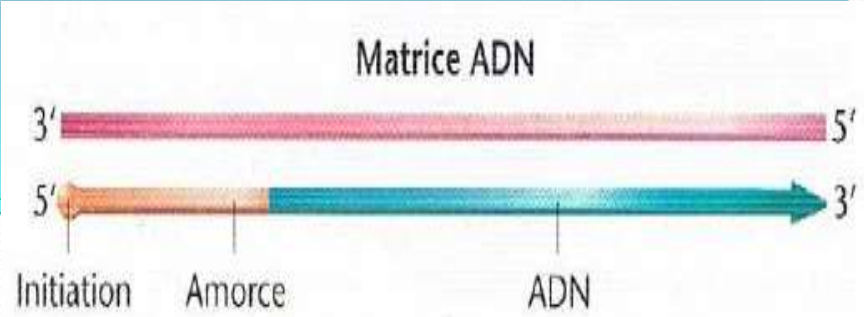


Toutes les enzymes ADN polymérases ajoutent les nucléotides libres seulement aux extrémités 3' des chaînes existantes, de sorte que les chaînes se développent à partir de leur extrémités 5' vers leurs extrémités 3'



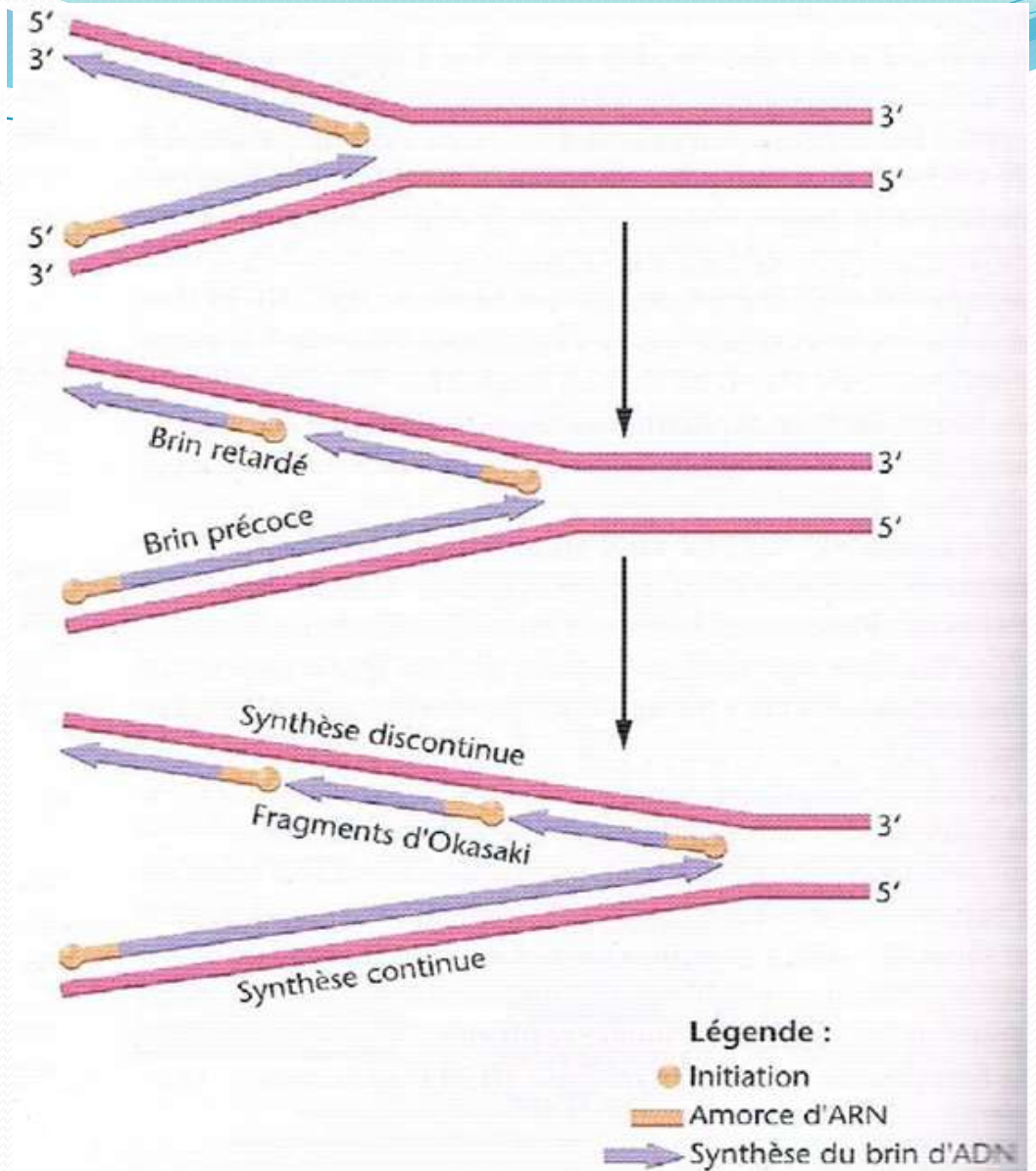
Par quel moyen l'ADN polymérase va initier la synthèse de l'ADN ? Comment est ajouté le premier nucléotide qui permet à la chaîne polynucléotidique de se développer ?



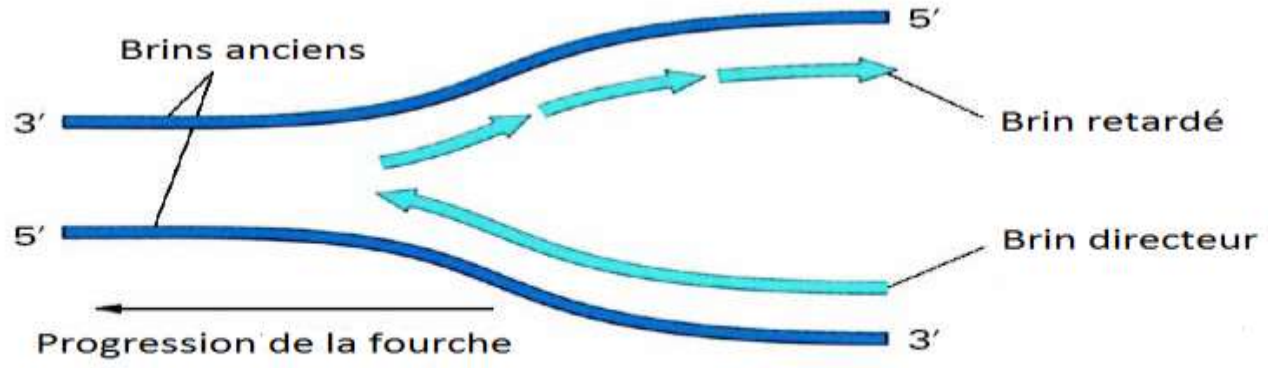


**FIGURE 11.10** Initiation de la synthèse de l'ADN. En premier lieu, une amorce d'ARN complémentaire est tout d'abord synthétisée, puis de l'ADN y est ajouté. Toute synthèse est orientée de 5' vers 3'. À la fin du processus, l'amorce d'ARN est remplacée par de l'ADN grâce à l'ADN polymérase I.

**Réponse:** l'ADN polymérase III requiert une amorce portant une extrémité 3' –hydroxyle libre pour allonger la chaîne polynucléotidique. Cette amorce est une molécule d'ARN synthétisée par une ARN polymérase appelée **primase**

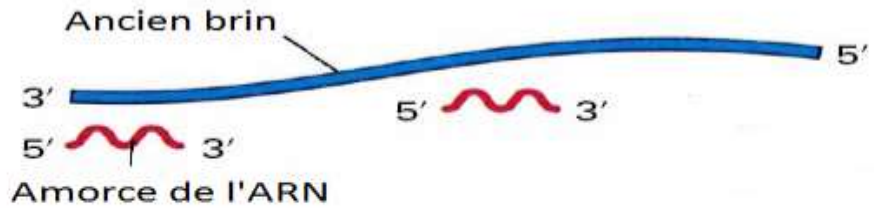


**FIGURE 11.11** L'ADN polymérase III synthétisant l'ADN de 5' vers 3', la synthèse de l'ADN le long des deux brins se fait selon une polarité opposée à cause de l'organisation antiparallèle des deux brins. Sur le brin retardé, la synthèse doit être discontinue, ce qui entraîne la production des fragments d'Okasaki. Sur le brin précoce, la synthèse est continue. Les amorces d'ARN permettent d'initier la synthèse des deux brins.

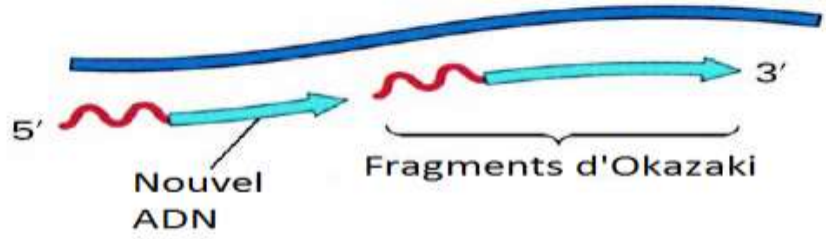


### Synthèse du brin retardé

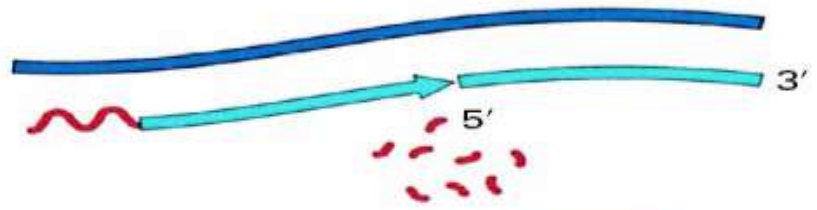
**(a)** Oligonucléotides de l'ARN (amorces) sur la matrice de l'ADN



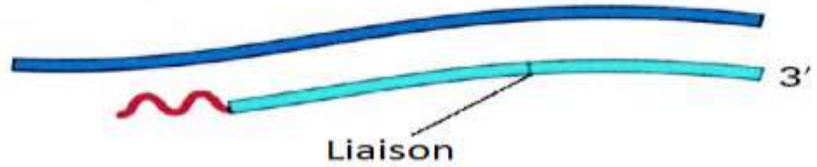
**(b)** L'ADN polymérase allonge les amorces de l'ARN avec un nouvel ADN

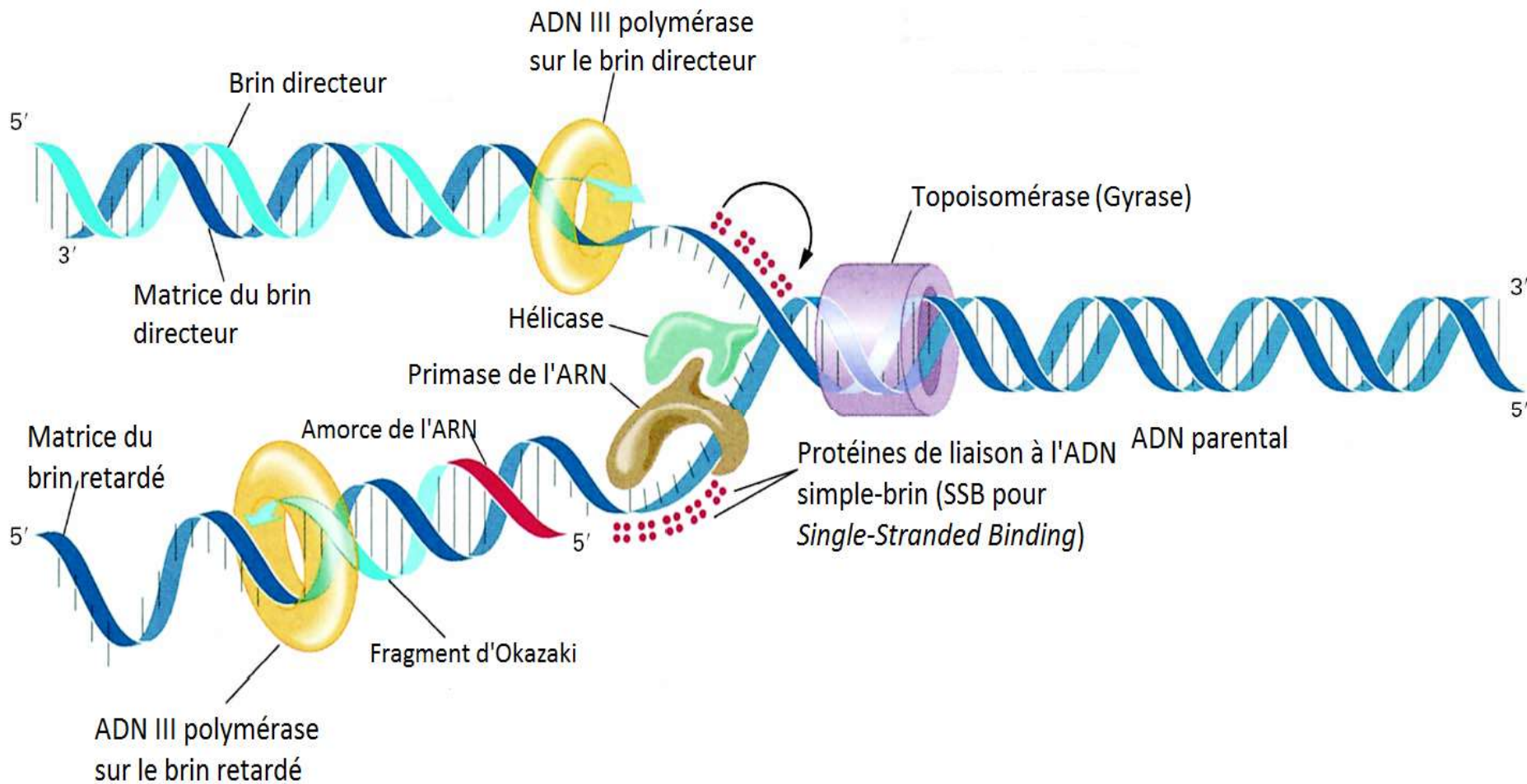


**(c)** L'ADN polymérase élimine l'ARN de chaque fragment



**(d)** L'ADN ligase joint les fragments d'Okazaki





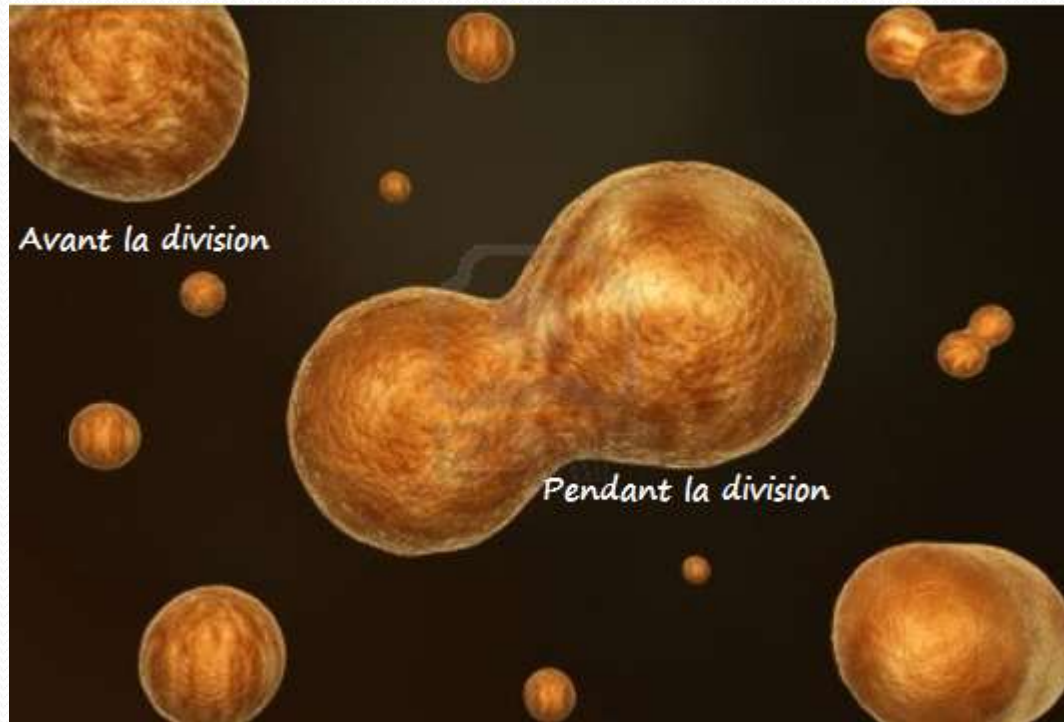
**Figure.** Résumé de la synthèse de l'ADN au niveau d'une fourche de réplication

# **LA DIVISION CELLULAIRE**



**POURQUOI ?**

□ C'est le mode de multiplication de toute  $\epsilon$  vivante.



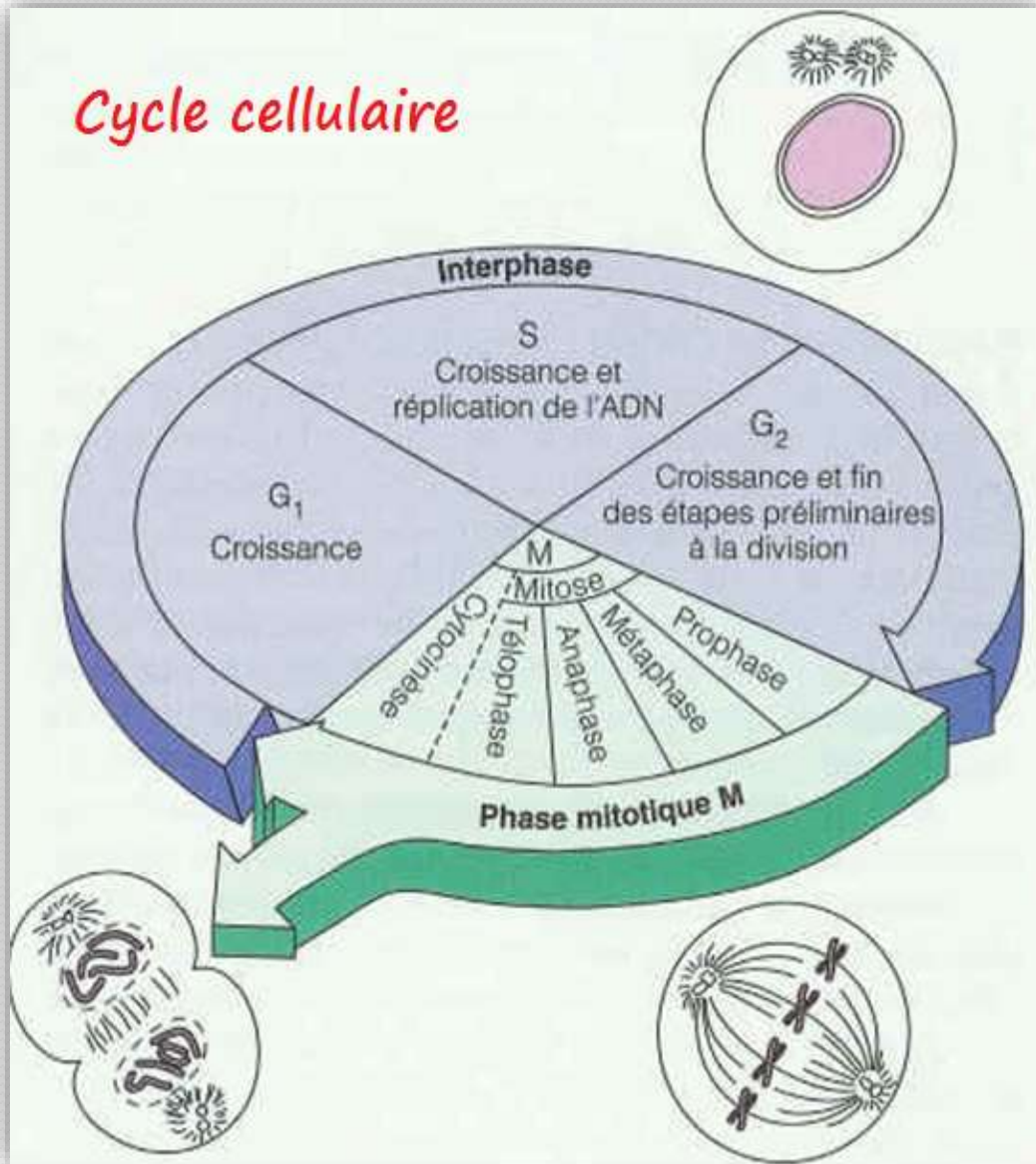
□ C'est donc un processus fondamental dans le monde vivant, puisqu'il permet la **croissance** et/ou la **régénération** des différents tissus constituant un organisme.

# Le cycle cellulaire:

- ✓ **L'interphase** (*préparation à la division*)
  - ✓ **La mitose** (*étape de la division*)
- ✓ **La cytokinèse** (*dernière phase de la division*)

# L'interphase

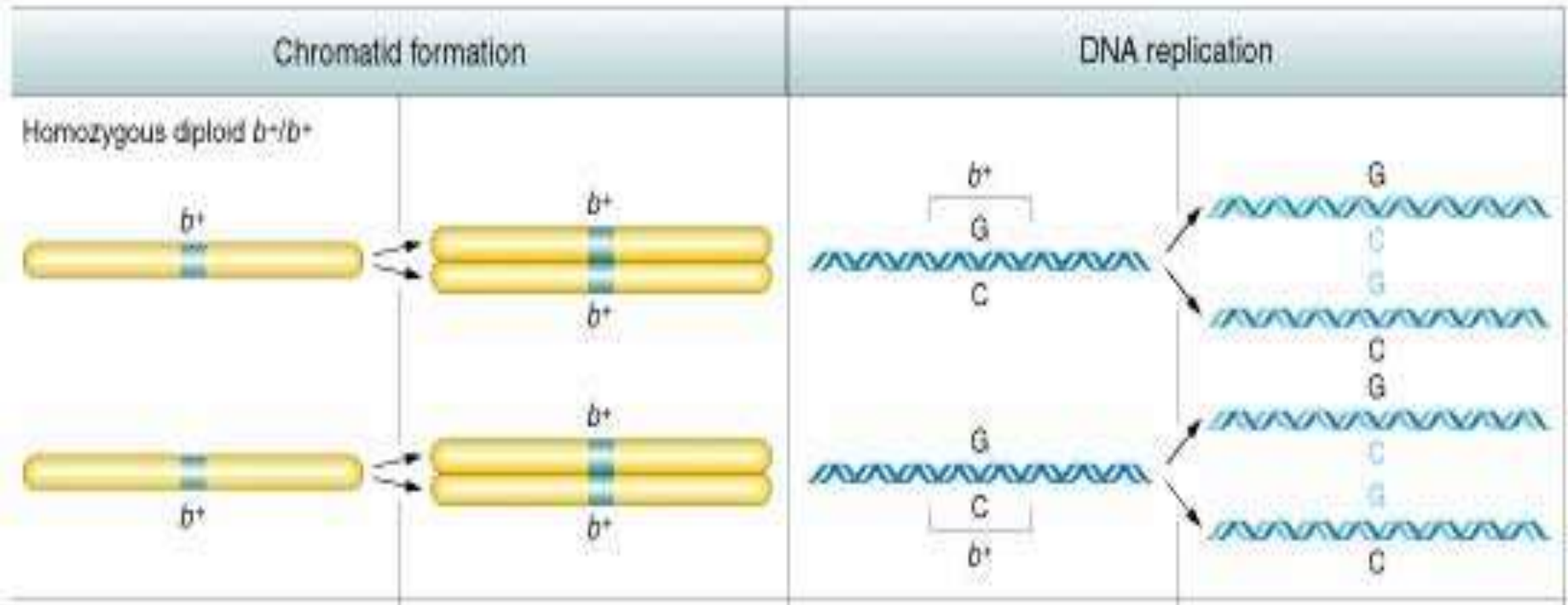
## Cycle cellulaire



- **G<sub>1</sub> (Gap1 ou intervalle 1)**: croissance et préparation à la réplication de l'ADN. Dure entre 6 à 12 h.
- **S (Synthèse)**: réplication de l'ADN et croissance. Dure entre 6 à 8 h.
- **G<sub>2</sub> (Gap2 ou intervalle 2)**: croissance et préparation à la division (mitose). Dure entre 3 à 4 h.

# Finalités de l'interphase

1. Croissance de la cellule
2. Duplication des chromosomes suite à la réplication de l'ADN
3. Préparation à l'entrée en division (mitose)

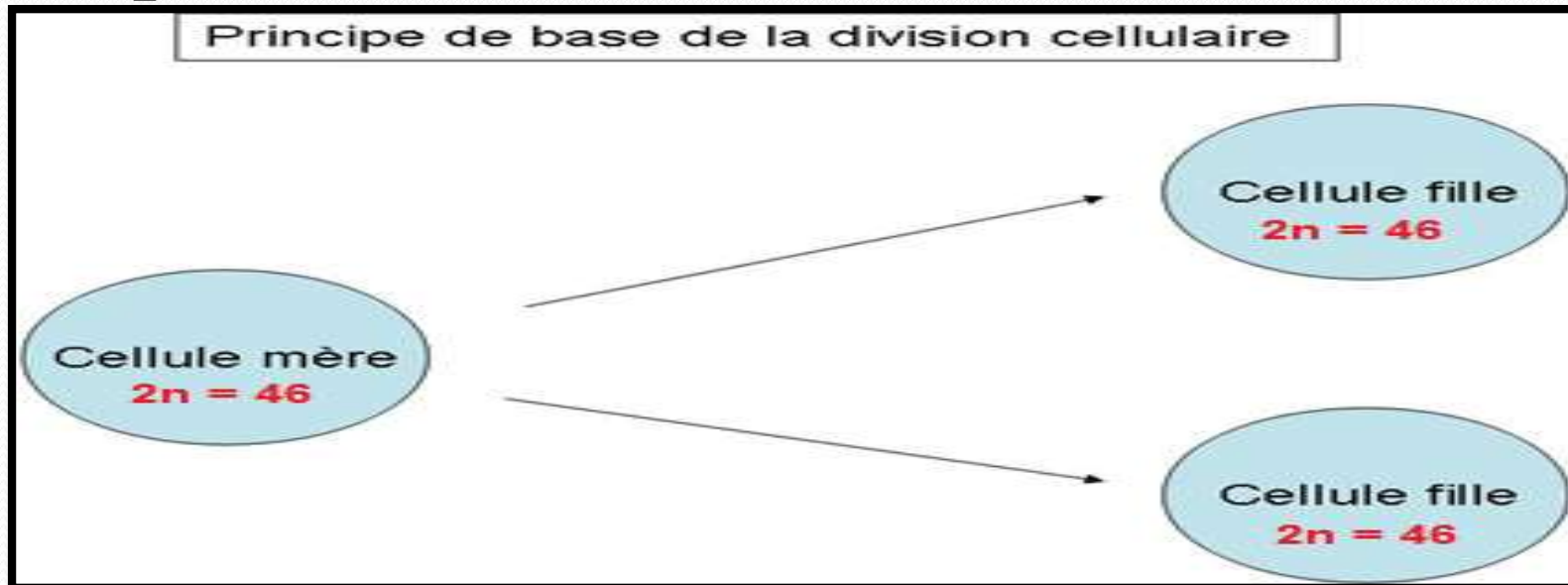




# Mitose

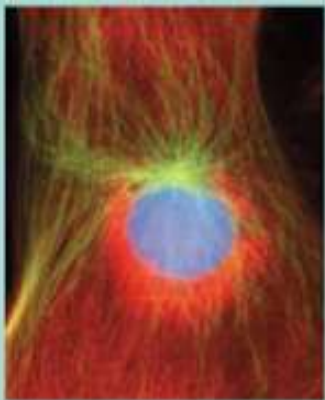
## Ce que vous devez savoir

- Seules les  $\varnothing$  **somatiques** sont capables de subir la mitose
- **Les 2  $\varnothing$  filles** issues de la mitose doivent contenir la **même information ou matériel génétique** que celle de la  $\varnothing$  mère dont elles sont issues.

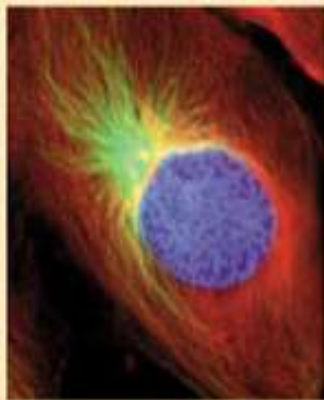


# LES PHASES DE LA MITOSE

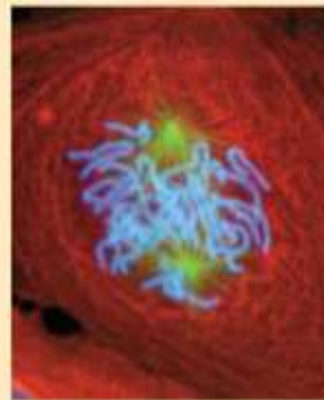
- 1) La Prophase:** *Formation des chromosomes visibles au microscope*
- 2) La Métaphase:** *Alignement des chromosomes au milieu de la  $\phi$*
- 3) L'Anaphase:** *Séparation et migration des chromatides sœur vers les pôles opposés de la  $\phi$*
- 4) La Téléphase:** *Fin de la mitose, apparition de 2  $\phi$  identiques non encore séparées*



**G<sub>2</sub> OF INTERPHASE**



**PROPHASE**

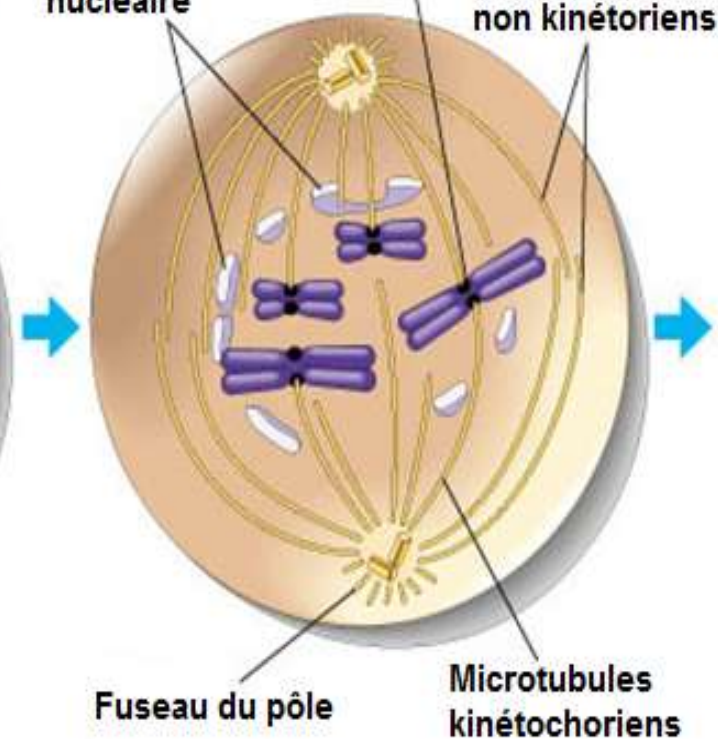
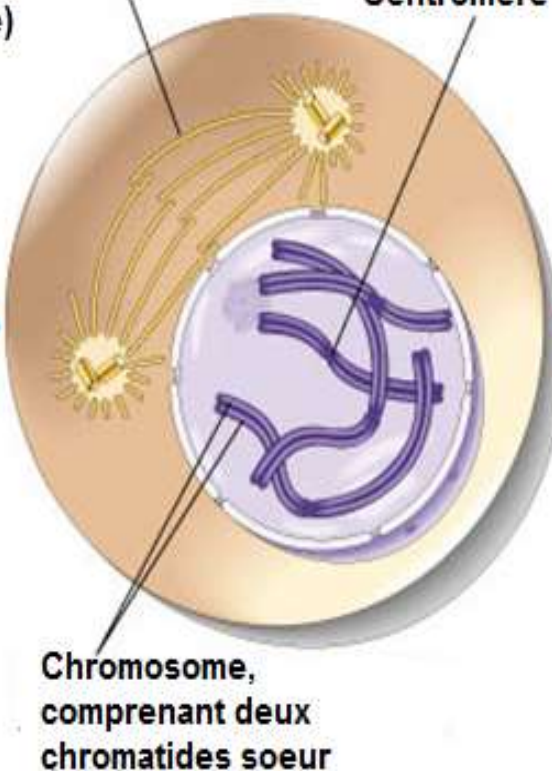
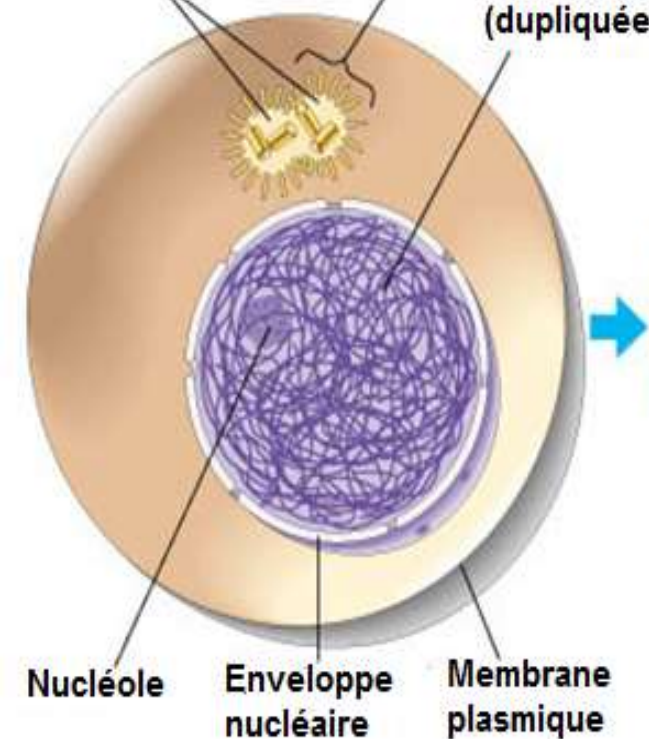


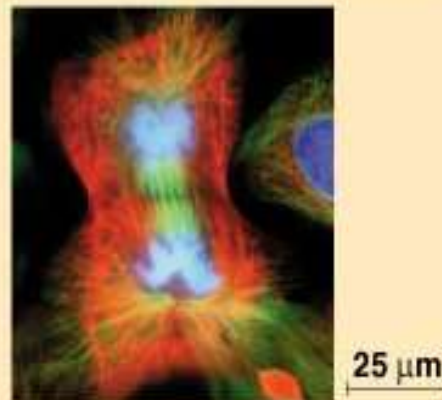
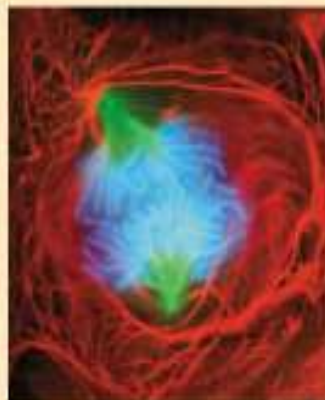
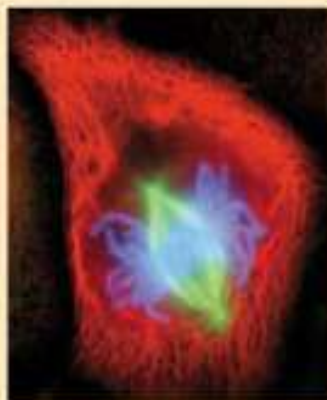
**PROMETAPHASE**

Centrosomes (avec paires centrioles) Aster Chromatine (dupliquée)

Formation du fuseau mitotique Centromère

Fragments de l'enveloppe nucléaire Kinétochore Microtubules non kinétochoriens

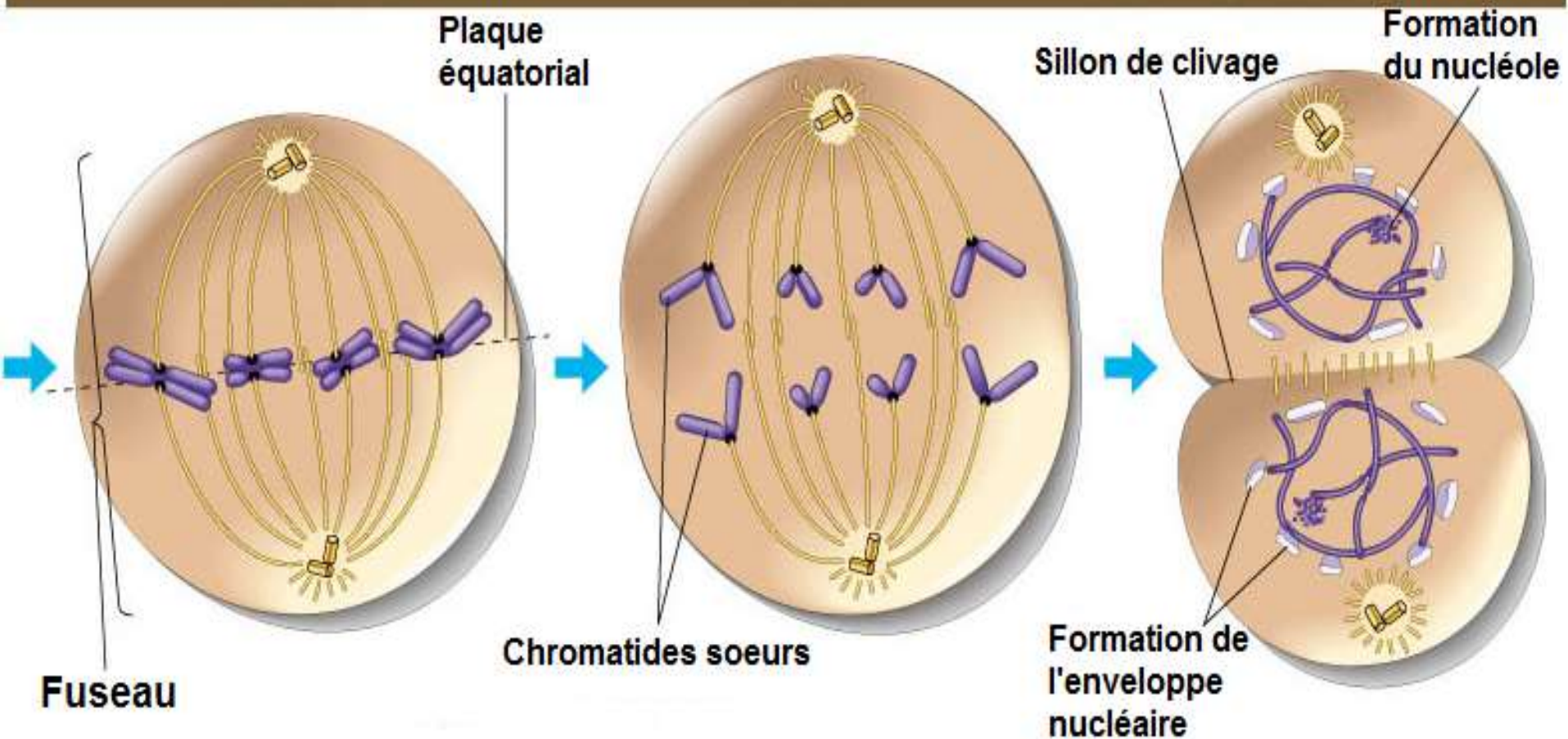




**METAPHASE**

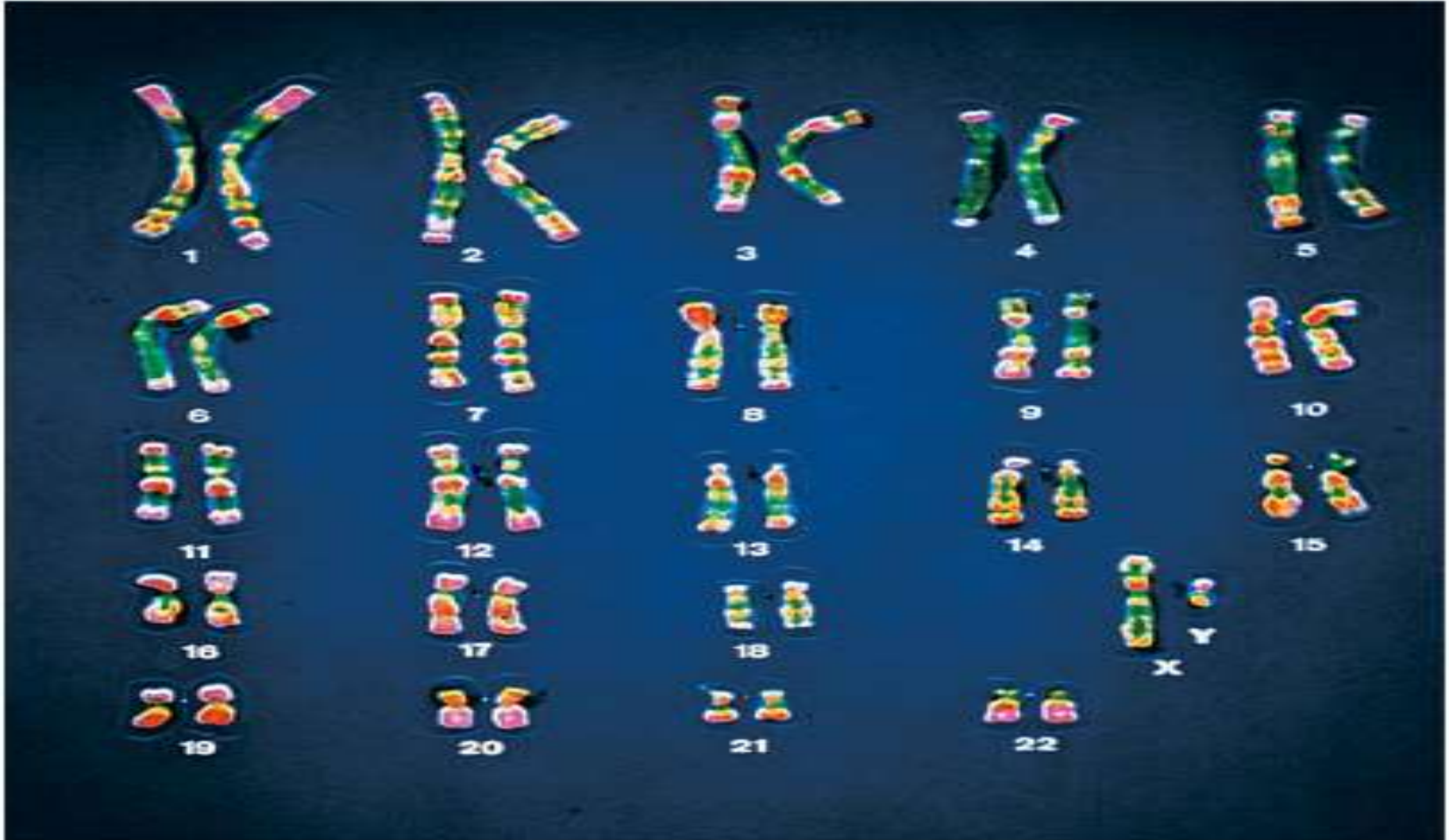
**ANAPHASE**

**TELOPHASE AND CYTOKINESIS**



# La métaphase

est le moment propice pour voir la morphologie des chromosomes (**caryotype**)



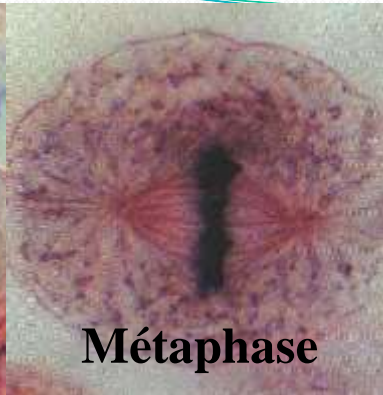
# MITOSE ANIMALE



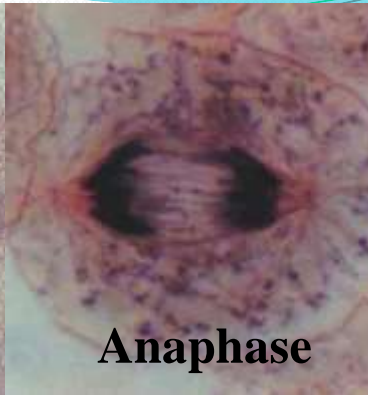
**Interphase**



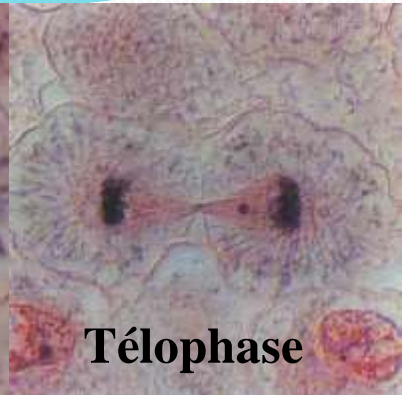
**Prophase**



**Métaphase**

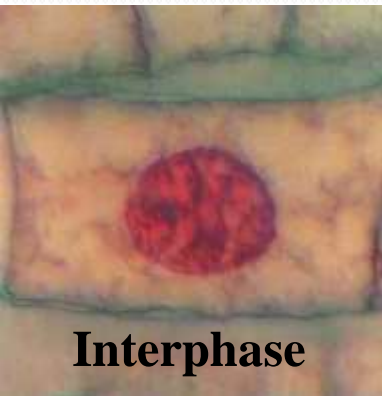


**Anaphase**

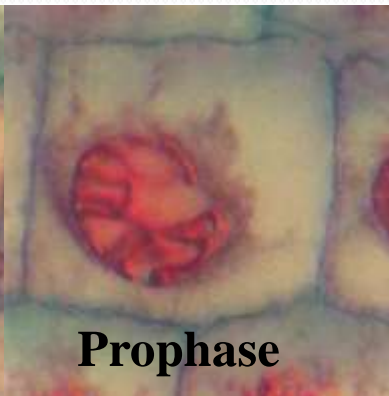


**Télophase**

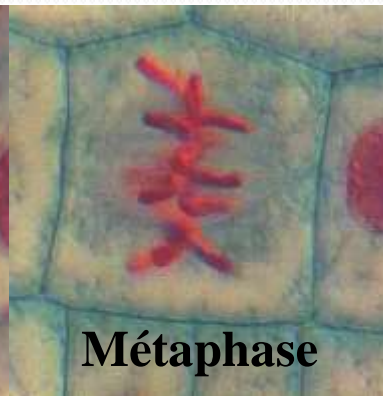
# MITOSE VEGETALE



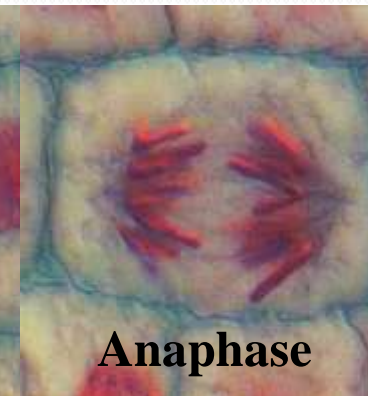
**Interphase**



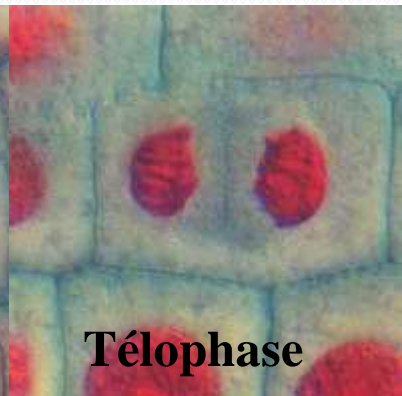
**Prophase**



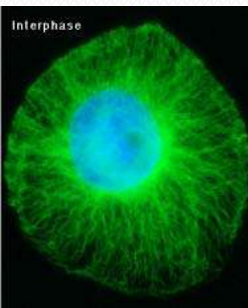
**Métaphase**



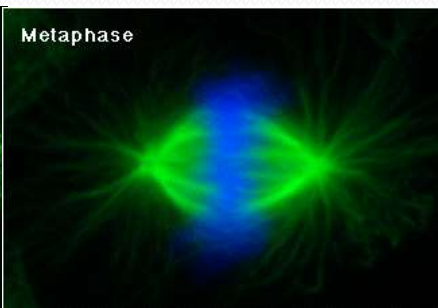
**Anaphase**



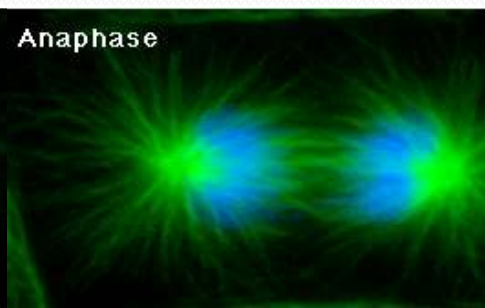
**Télophase**



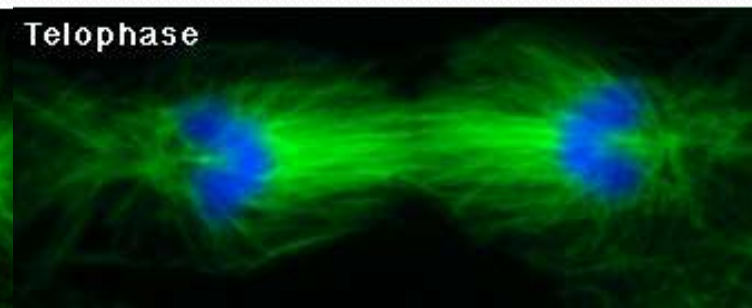
**Interphase**



**Metaphase**

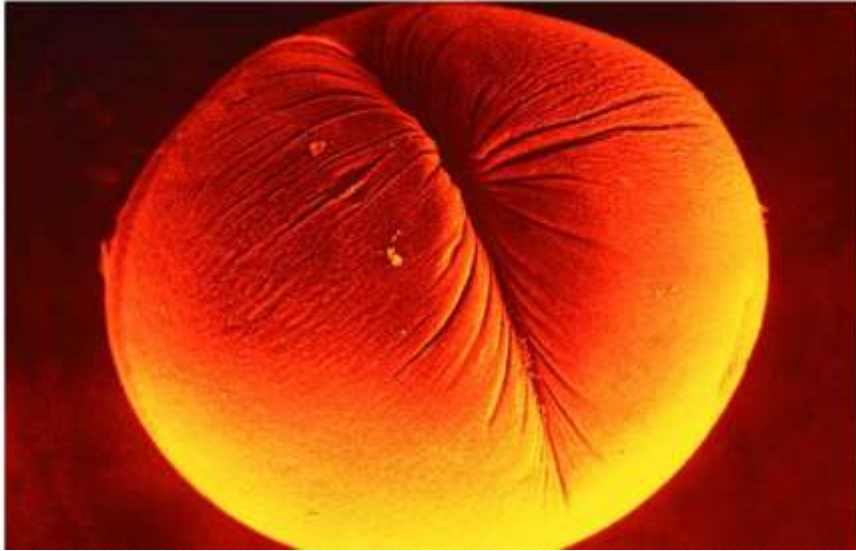


**Anaphase**



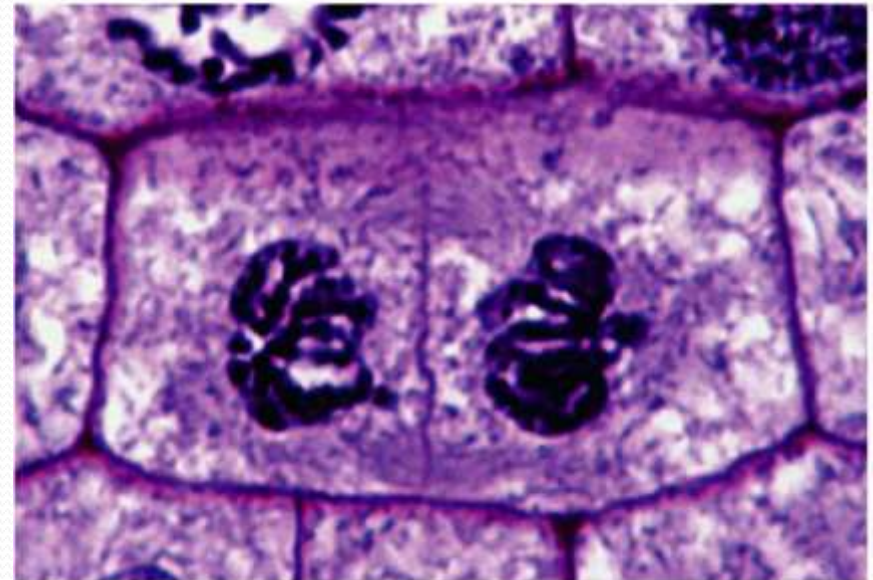
**Telophase**

# Cytocinèse

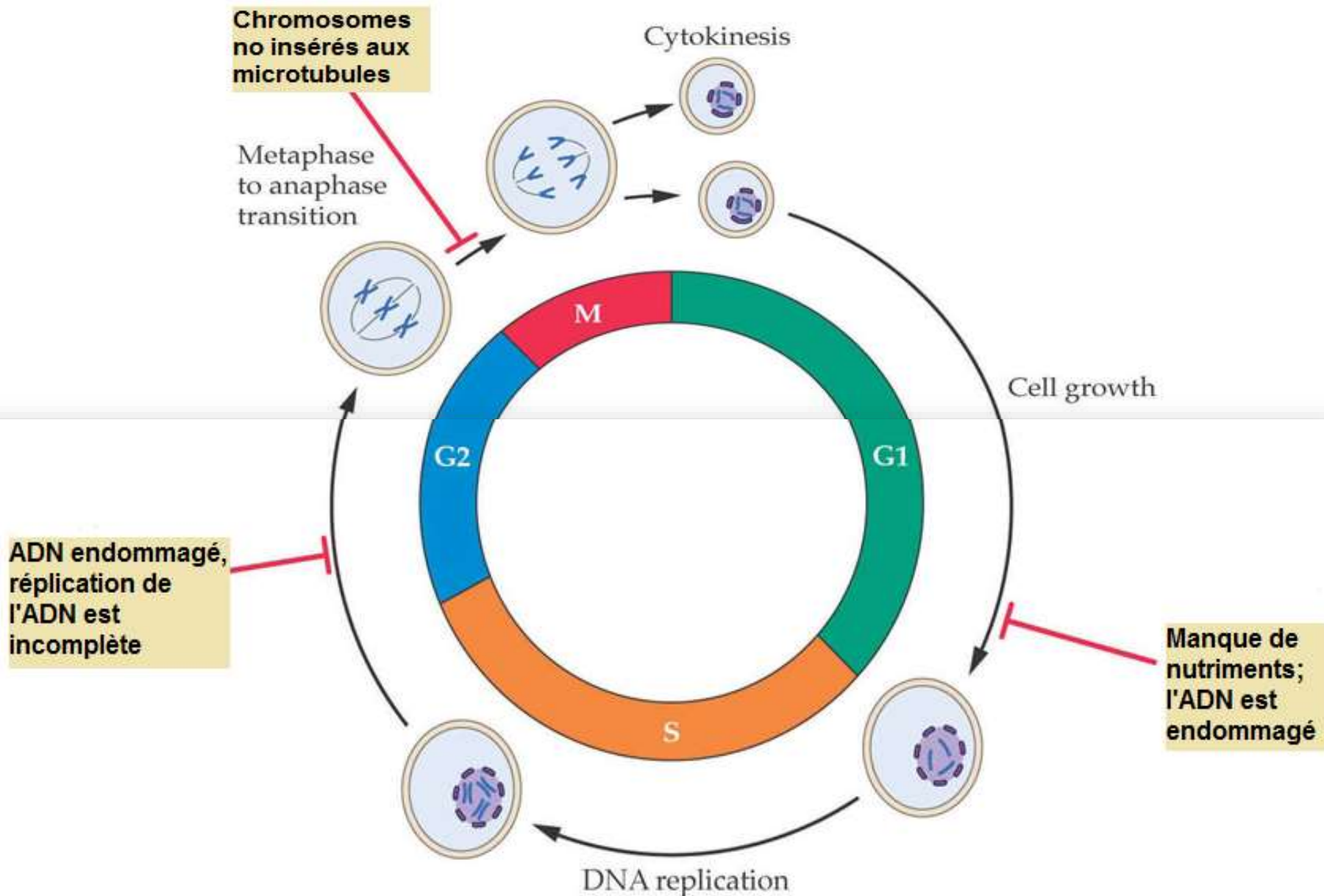


Chez les animaux, un anneau contractile de filaments d'actine et de myosine divisera la cellule par clivage ou strangulation

Chez les végétaux, une plaque de composants de la paroi (vésicules de l'appareil Golgi) est formée progressivement à partir du centre de la cellule et la divise par cloisonnement

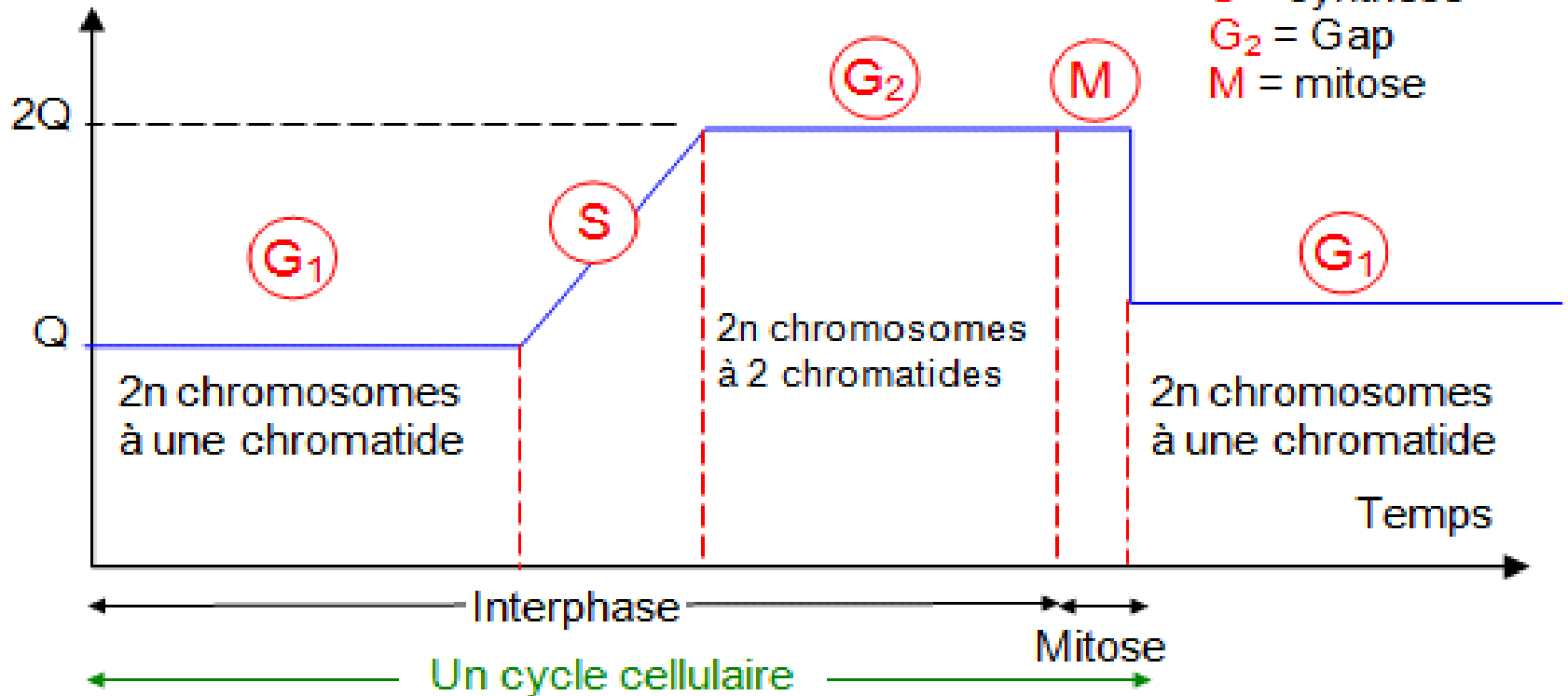


# Régulation du cycle cellulaire : *Trois points de contrôle* assurent le bon déroulement du cycle cellulaire





Masse d'ADN  
par cellule



Q = 7,3 pg (picogrammes)

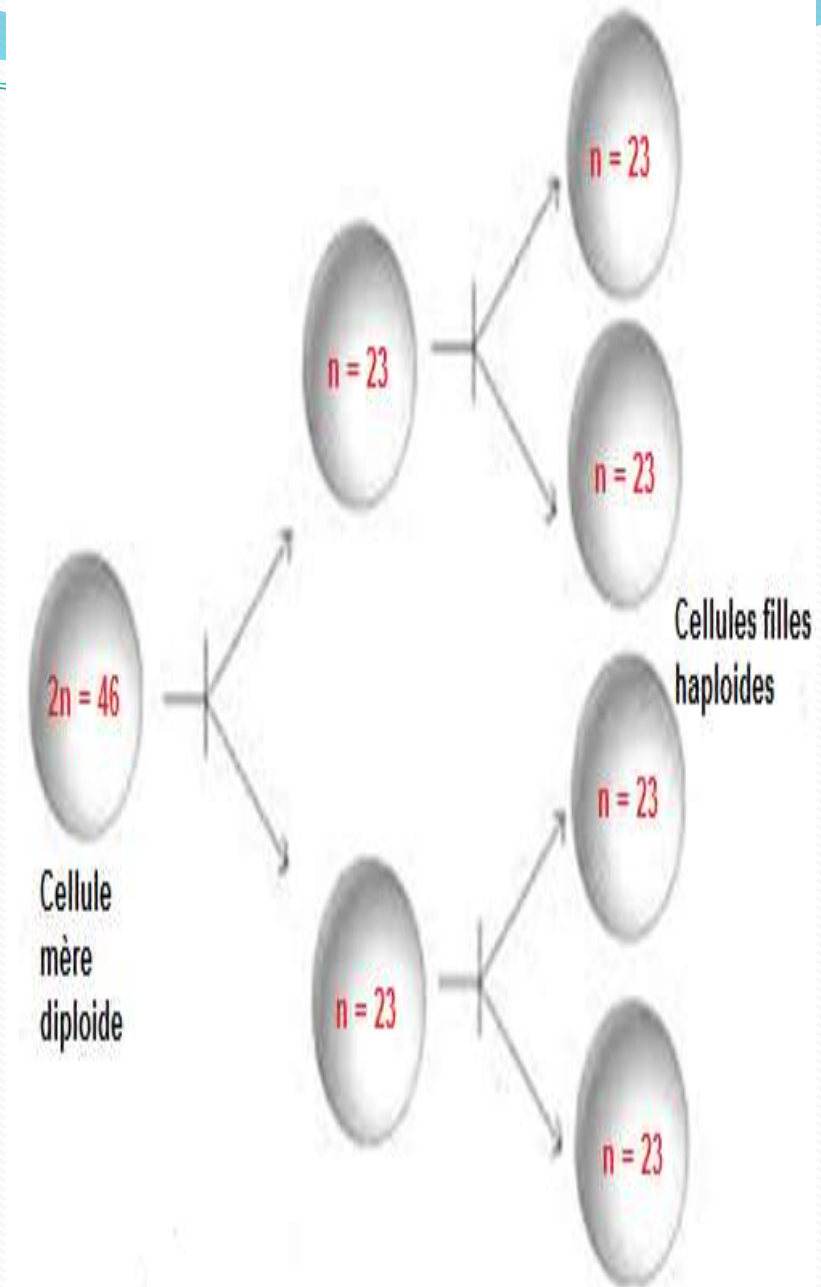
© Georges Dolisi

**Evolution de la masse d'ADN dans une cellule pendant le cycle cellulaire**

# Méiose

Ce que vous devez savoir

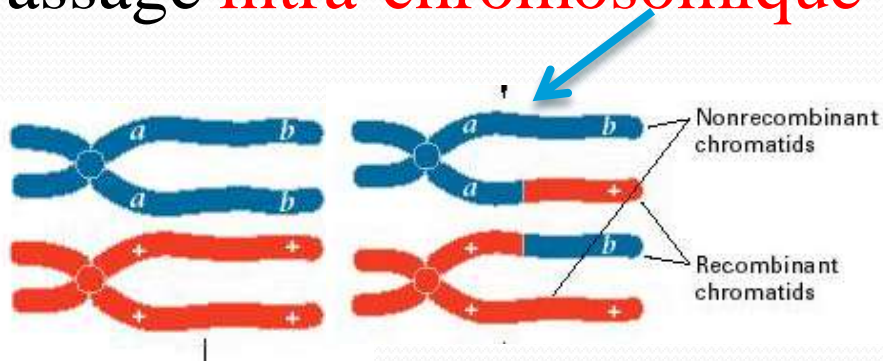
- Seules les  $\varnothing$  germinales (sexuelles) sont capables de subir la méiose
- La méiose aboutit à la production de  $\varnothing$  sexuelles ou gamètes pour la reproduction
- les 4 gamètes issus de la méiose doivent contenir la moitié du matériel génétique que celle de la  $\varnothing$  mère dont elles sont issues



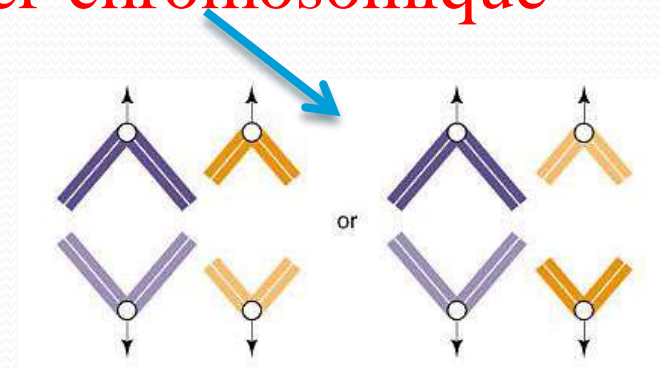
# Ce que vous devez savoir

- C'est durant la méiose que se produit la **recombinaison génétique**
- La recombinaison génétique est l'une des sources importante de la **variabilité génétique (diversité)**
- L'ensemble des recombinaisons génétiques au sein d'une population entière est appelé **brassage génétique**
- le brassage génétique recouvre 2 processus complémentaires:

Le brassage **intra-chromosomique** et **inter-chromosomique**



**Enjambement ou *crossing-over***  
(Prophase I)



**Ségrégation indépendante des chromosomes homologues** (Métaphase I)

# Recombinaisons possibles (gamètes) entre les différents chromosomes paternels et maternels (Métaphase I)

**Fourmi** =  $2^1 = 2$

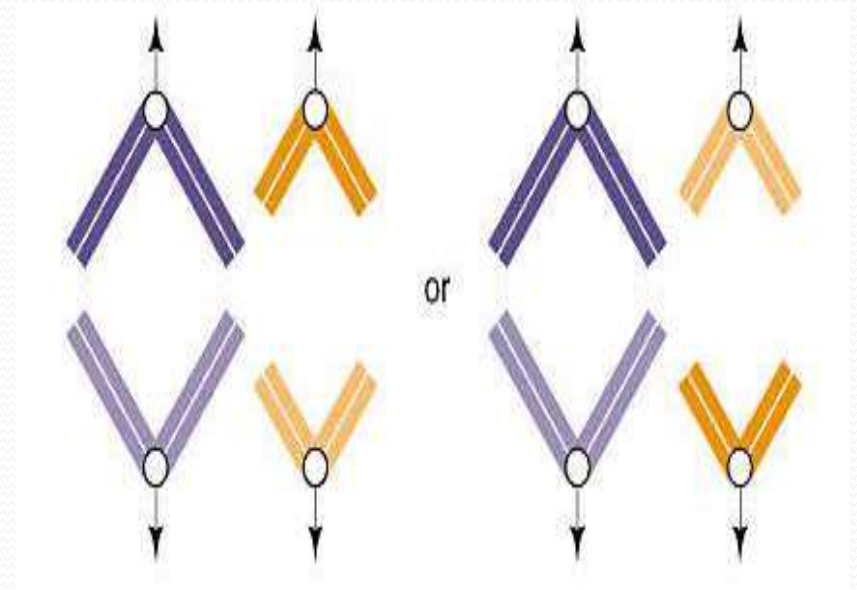
**Drosophile** =  $2^4 = 16$

**Orge** =  $2^7 = 128$

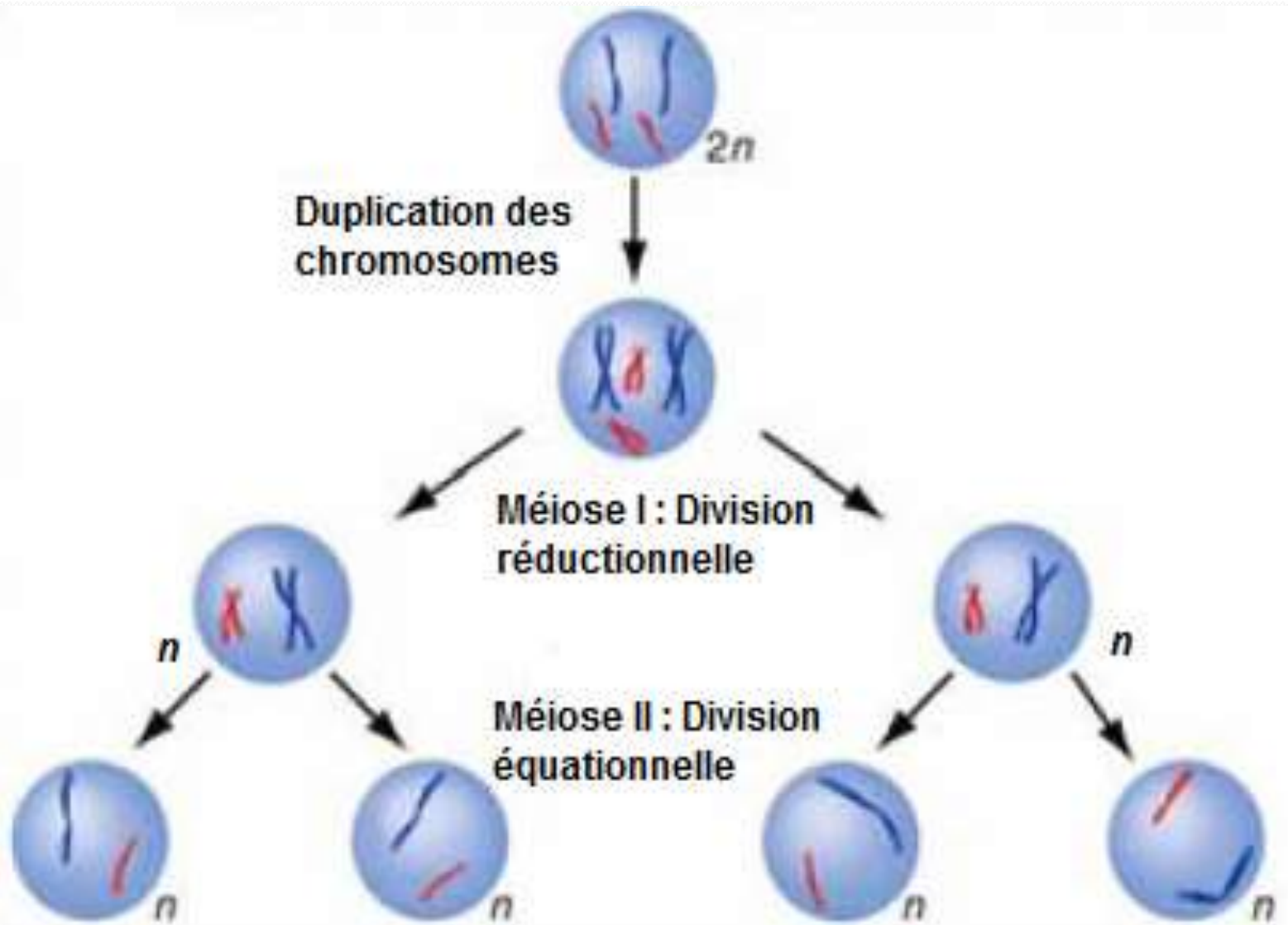
**Blé** =  $2^{21} = 2.097.152$

**Homme**:  $2^{23} = 8.388.608$

**Vache** =  $2^{60} > 1,15 \times 10^{18}$



# La Méiose peut être divisée en 2 phases (Méiose I et II)



# Méiose I

INTERPHASE

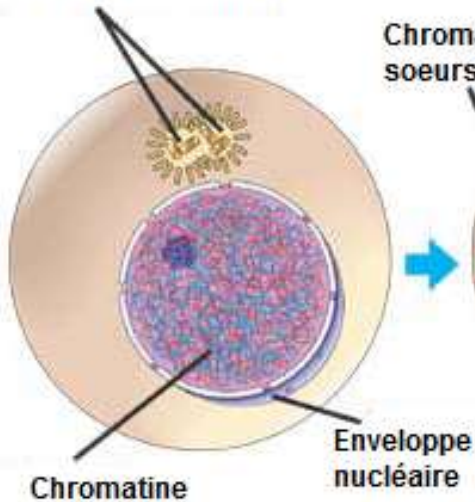
MEIOSIS I: Separates homologous chromosomes  
(Division réductionnelle)

PROPHASE I

METAPHASE I

ANAPHASE I

Centrosomes  
(avec paires centrioles)



Chromatides  
soeurs

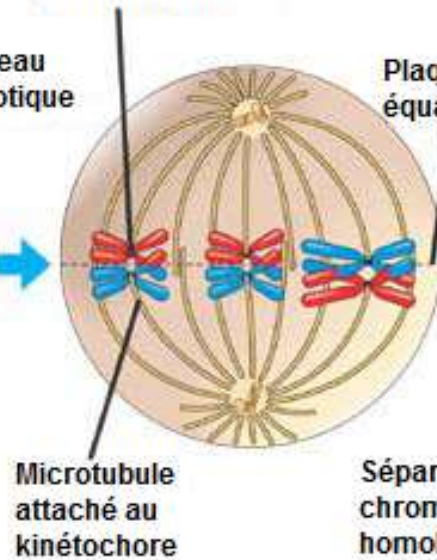
Chiasma

Fuseau  
mitotique

Bivalent (tétrade)

Paires de chromosomes  
homologues (rouge et bleu)  
et échange des ségments  
(Crossing-over)

Centromère (avec  
kinétochore)



Plaqué  
équatoriale

Alignement des bivalents

Chromatides  
soeurs restent  
attachées

Séparation des  
chromosomes  
homologues

Séparation des paires de  
chromosomes homologues

Duplication des chromosomes

# Méiose II

MEIOSIS II: Separates sister chromatids  
(Division équationnelle)

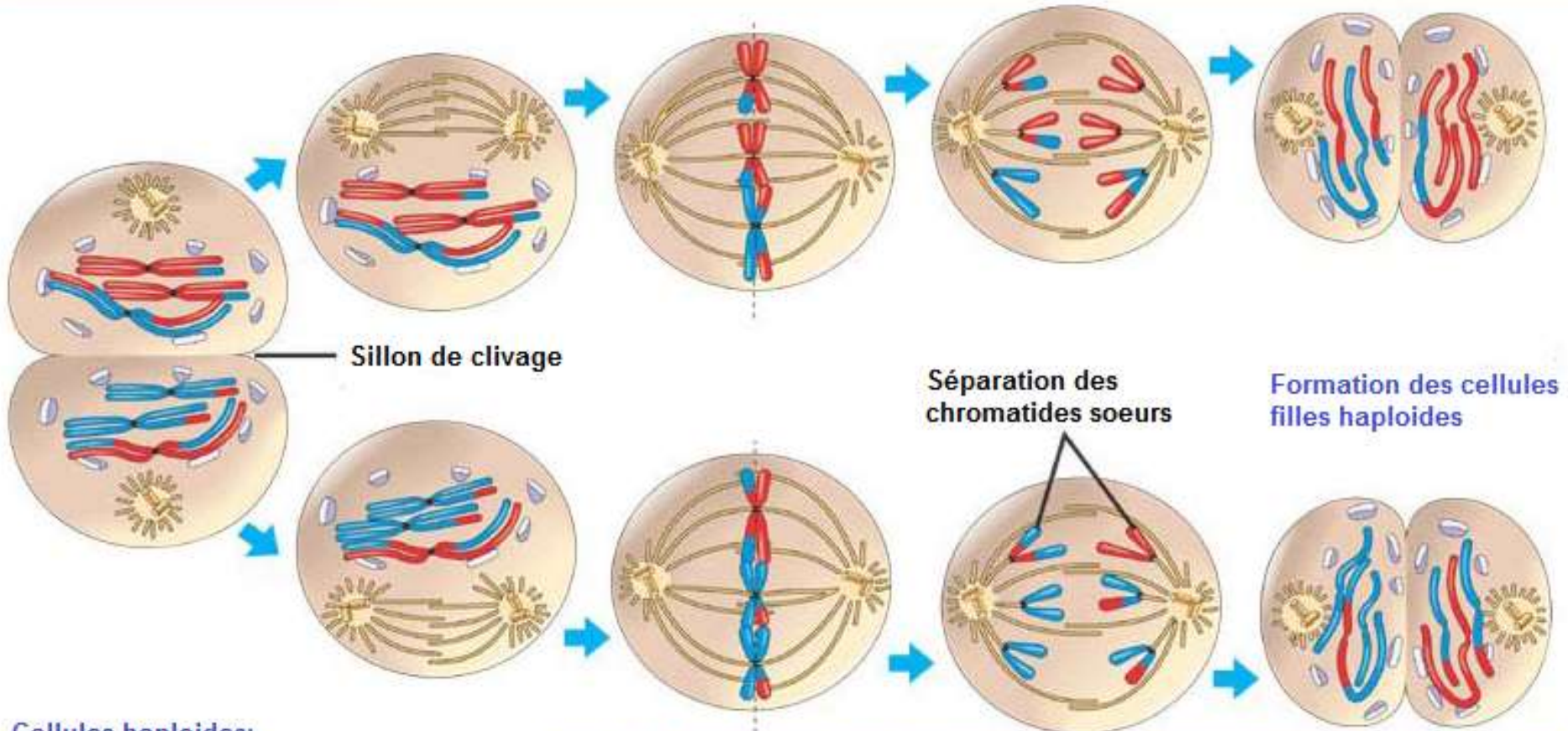
TELOPHASE I AND  
CYTOKINESIS

PROPHASE II

METAPHASE II

ANAPHASE II

TELOPHASE II AND  
CYTOKINESIS



Cellules haploides;  
les chromosomes  
restent dupliqués

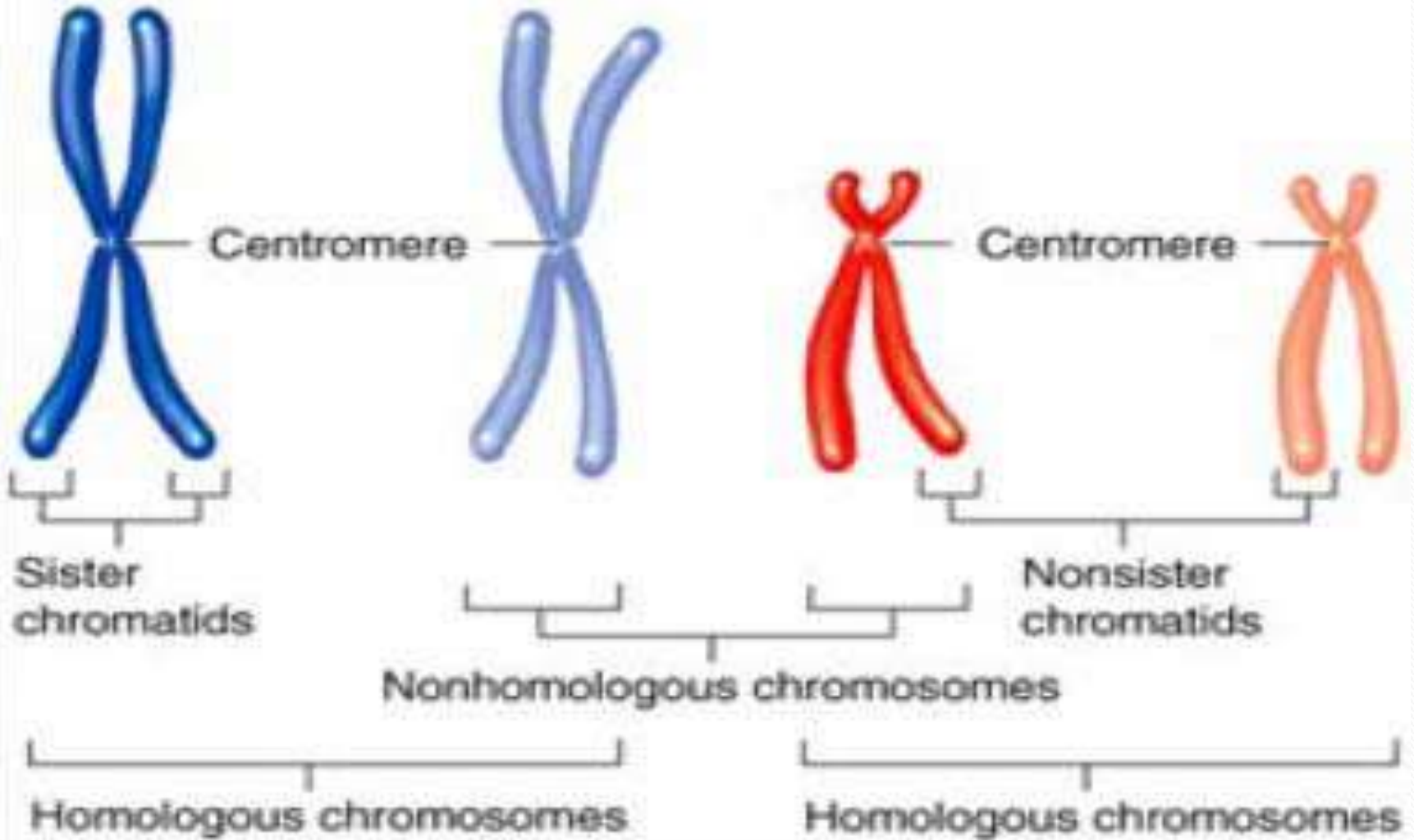
C'est finalement au cours de ce deuxième cycle de division cellulaire que les chromatides soeurs se séparent; il en résulte 4 cellules filles haploides contenant un chromosome à un seul chromatide

# Les chromosomes homologues s'apparient lors de la Prophase I

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

**Pair of homologous metacentric chromosomes**

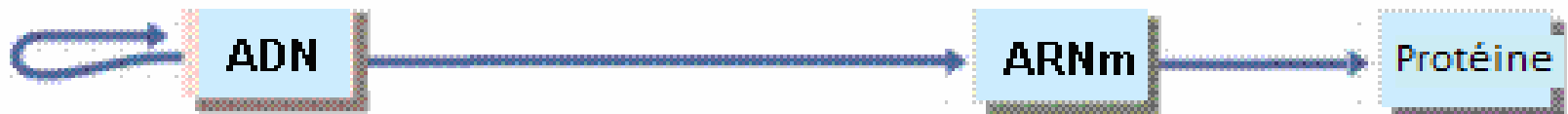
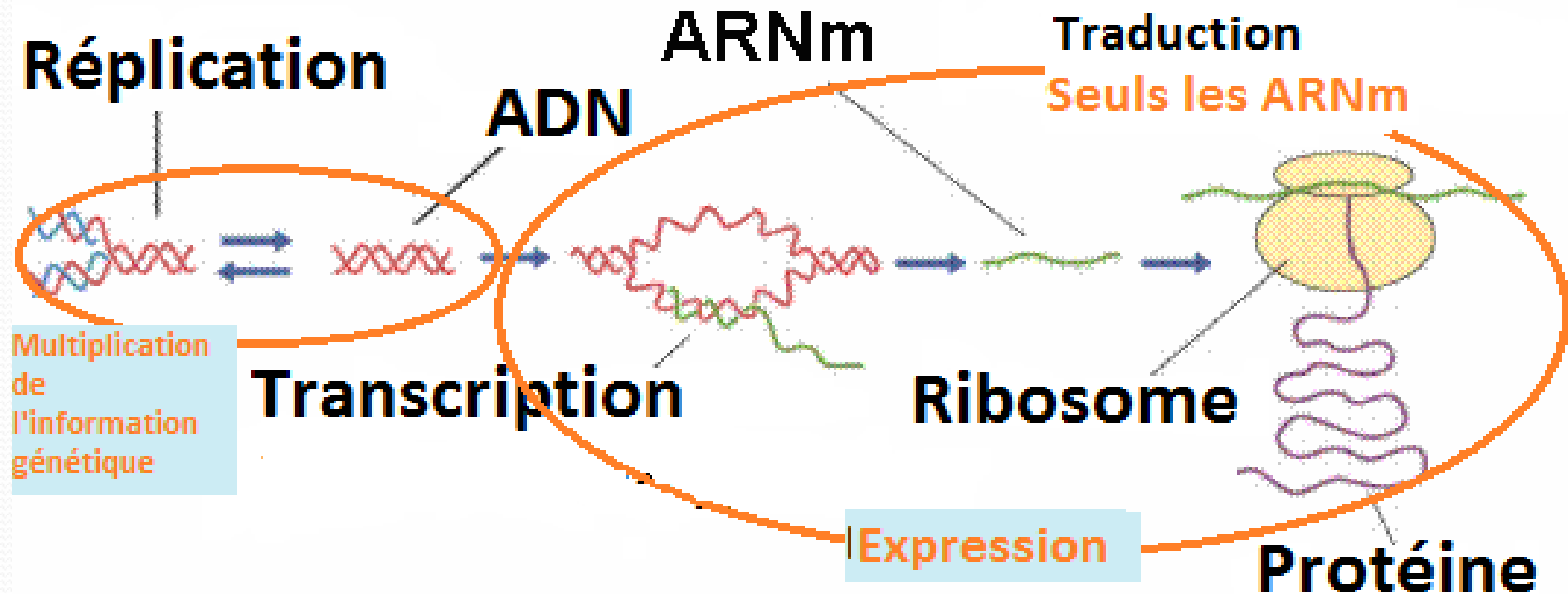
**Pair of homologous acrocentric chromosomes**

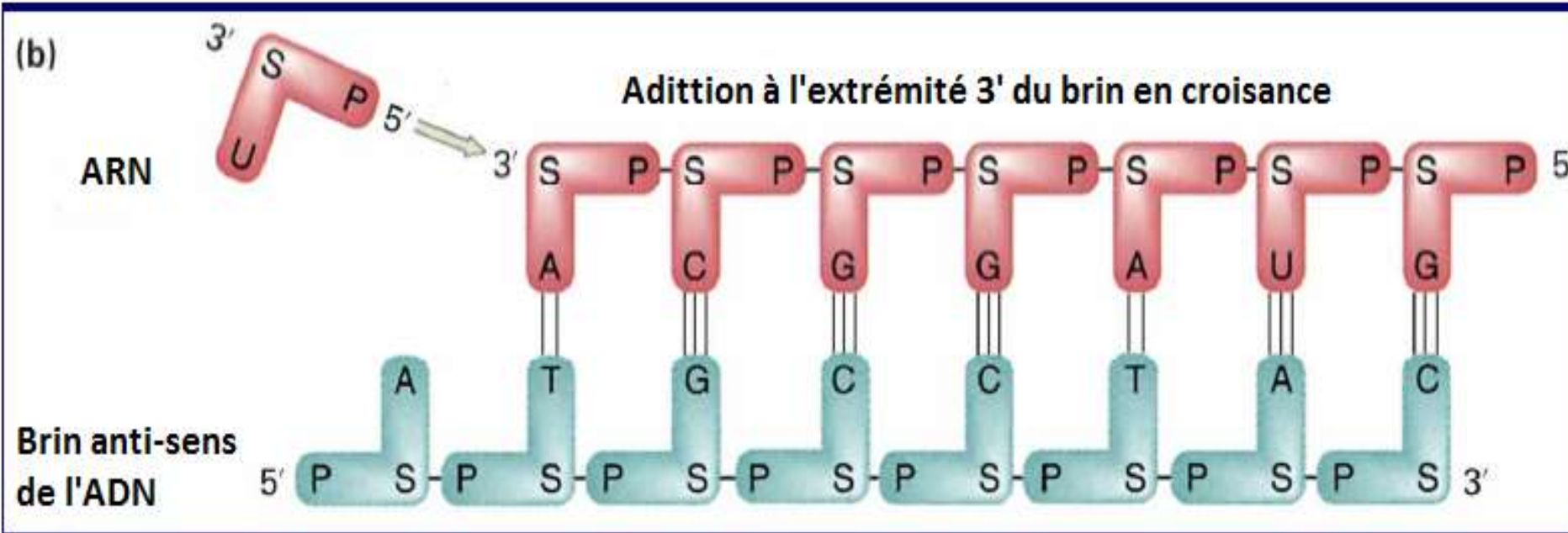
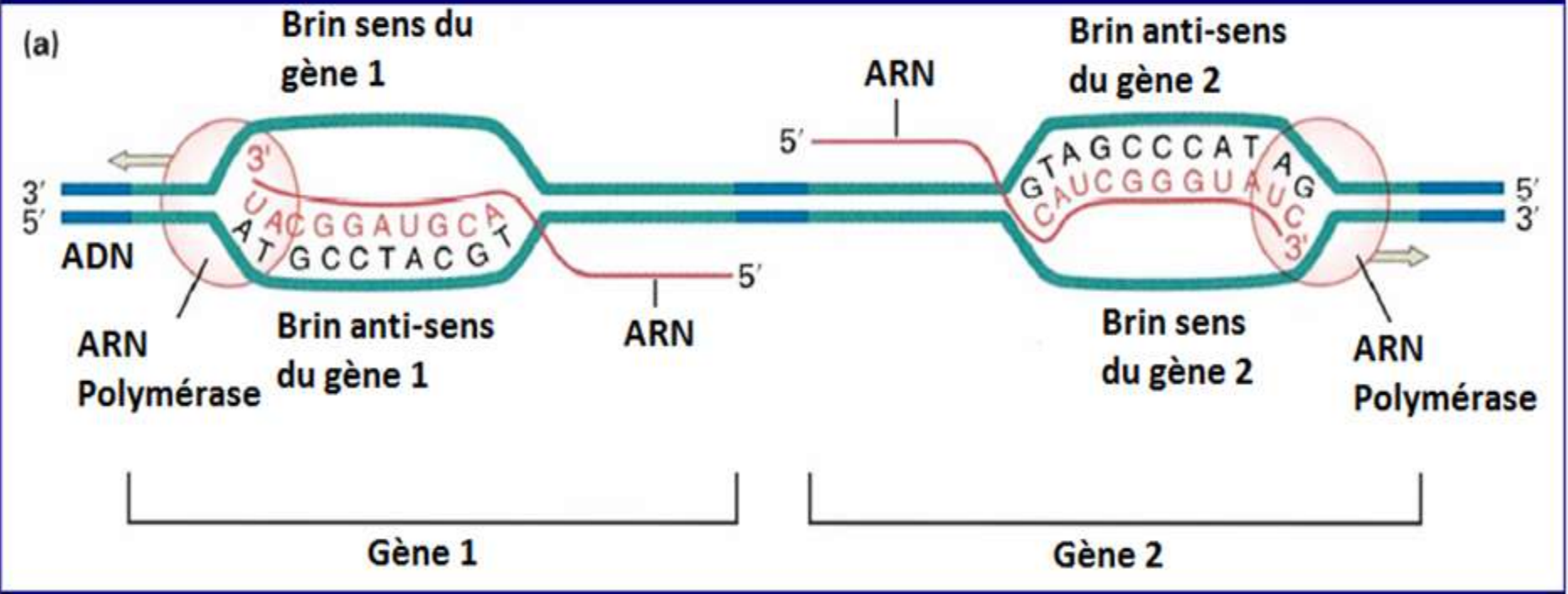


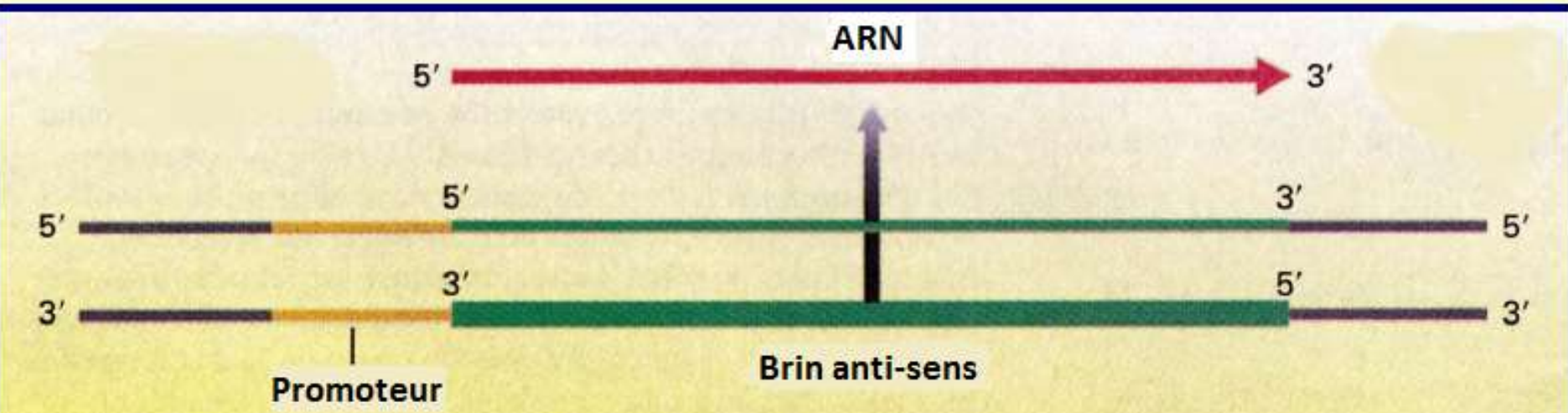
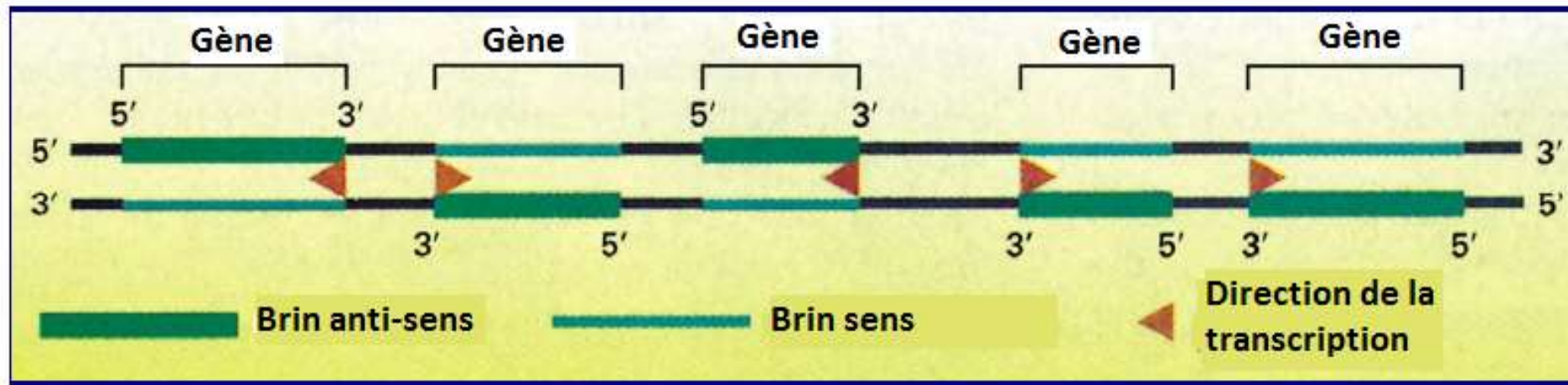


# La Transcription

Dogme central de la biologie moléculaire (Crick, 1970)







## Eukaryotic RNA polymerase

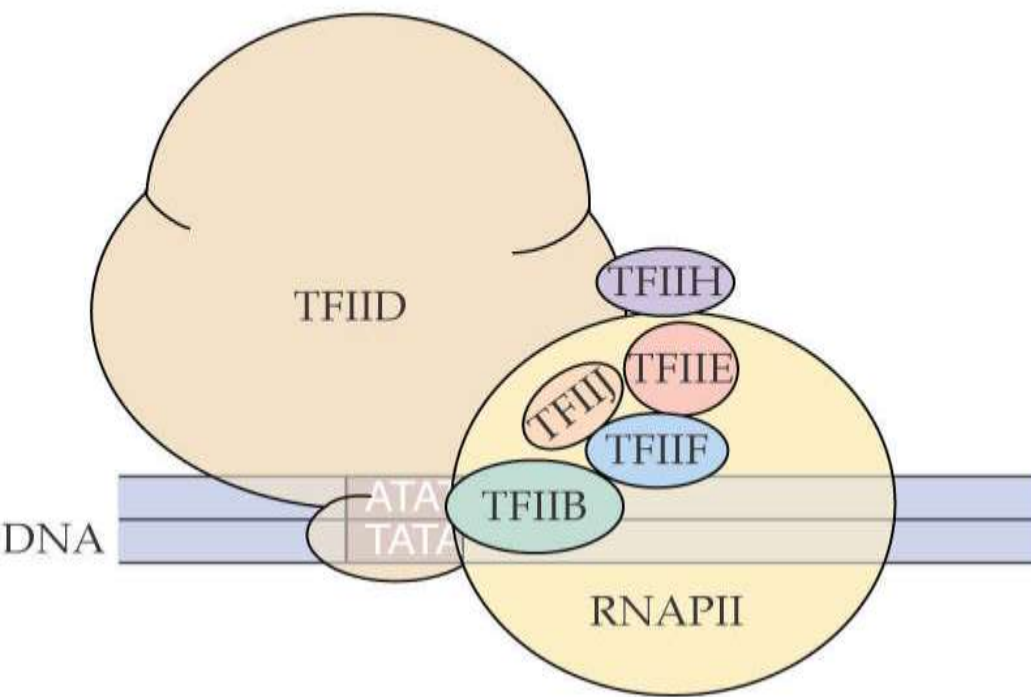


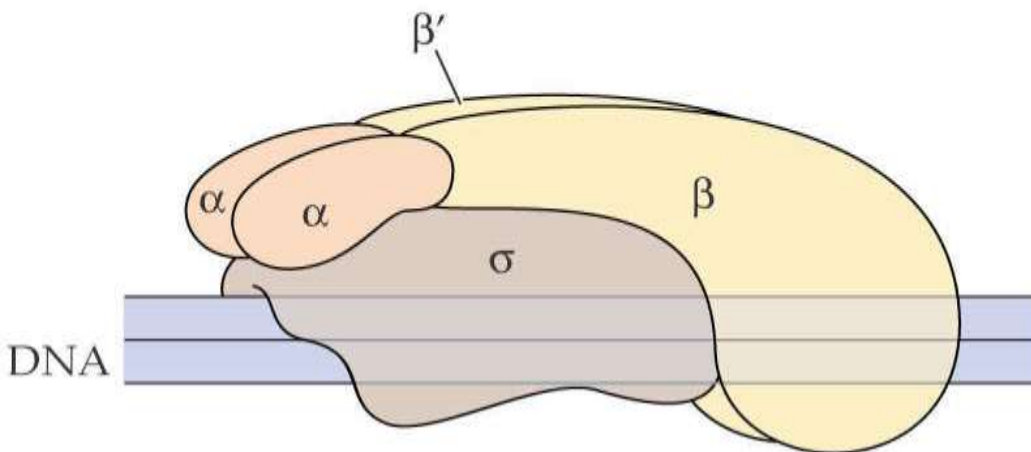
TABLEAU 13.7

## ARN POLYMÉRASES

CHEZ LES EUCARYOTES

Type	Produit	Localisation
I	ARNr	Noyau
II	ARNm, ARNsn	Nucléoplasme
III	ARNr 5S, ARNt	Nucléoplasme

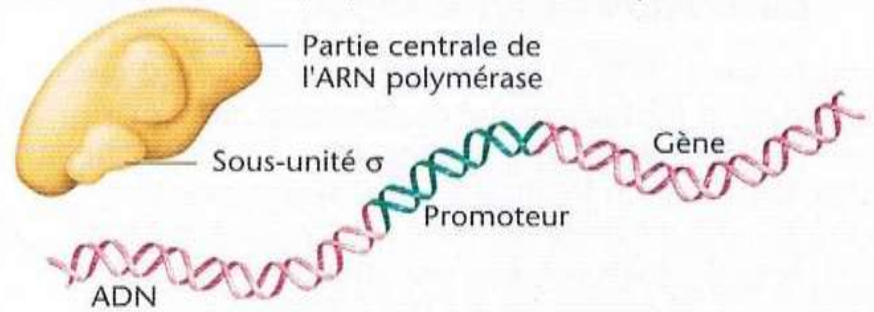
## *E. coli* RNA polymerase



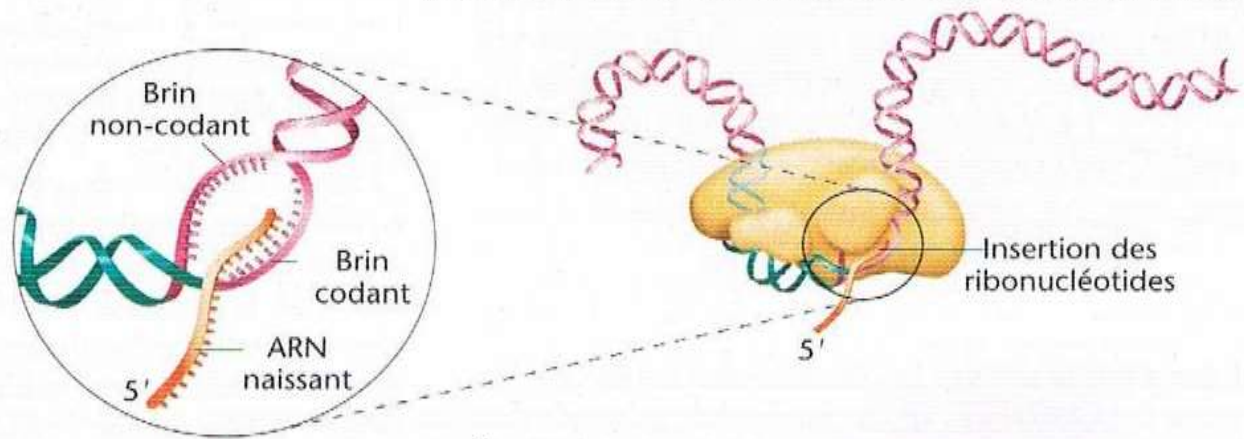
## ARN polymérase chez les procaryotes

ARN polymérase  
 $\alpha_2 \beta \beta' \sigma$

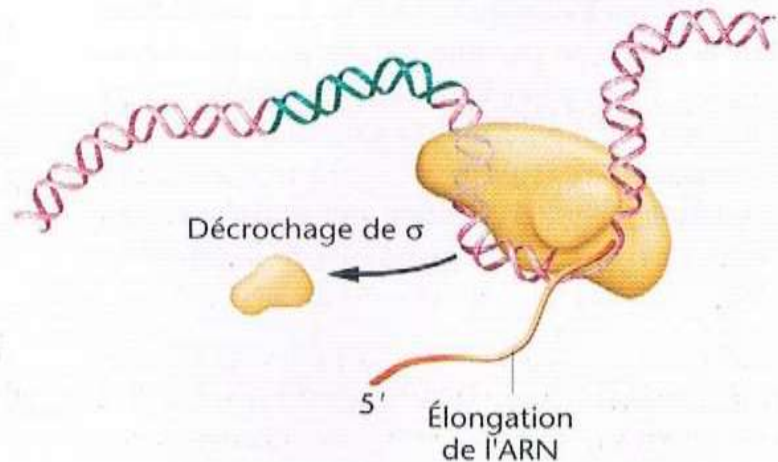
(a) Composants impliqués dans la transcription



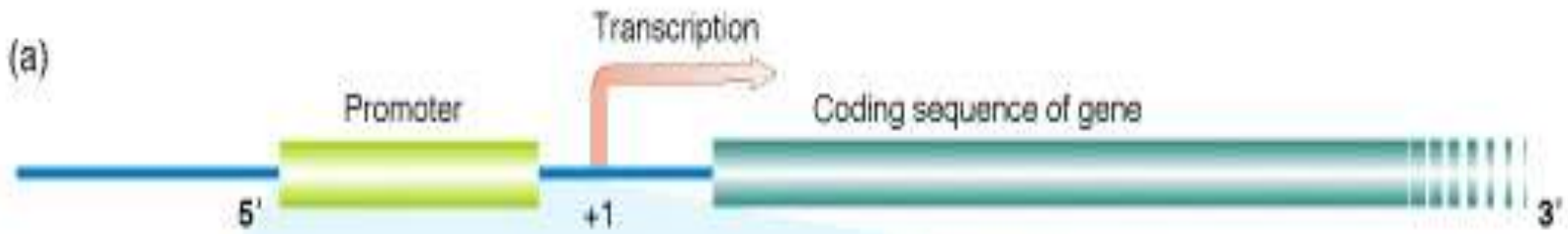
(b) Liaison au brin d'ADN matrice et initiation de la transcription



(c) Élongation



**FIGURE 13.9** Représentation des premières étapes de la transcription chez les procaryotes. (a) Les composants impliqués dans ce processus ; (b) fixation de la sous-unité  $\sigma$  de l'ARN polymérase au site -10 du brin matrice et initiation de la synthèse de l'ARN ; (c) élongation de l'ARN, après décrochage de la sous-unité  $\sigma$  du complexe de transcription, et déplacement de l'ARN polymérase le long du brin d'ADN matrice.



(b) Strong *E. coli* promoters

tyr tRNA <sup>D</sup>	TCTCAACGTAACACTTTACAGCGGCGY YCGTCATTTGATATGATGTCYGCCCGCTTCCCGATAAGGG
rrn D1	GATCAAAAAAATACTTTGTGCAAAAAA ¥¥TTGGGATCCCTATAATGCGCCTCCGTTGAGACGACAACG
rrn X1	ATGCATTTTTCGGCTTTGTCTT CCTGA ¥¥GCCGACTCCCTATAATGCGCCTCCA TCGACACGGCGGAT
rrn (DXE) <sub>20</sub>	CCTGAAATTCAGGGTTGACTCTGAAA ¥¥GAGGAAAGCGTAATATA CYGCCACCTCGCGACAGTGAGC
rrn E1	CTGCAATTTTCTATTGCGGCCTGCG ¥¥GAGA ACTCCCTATAATGCGCCTCCA TCGACACGGCGGAT
rrn A1	TTTTAAATTTCTCTTTGTCAGGCGG ¥¥AATAACTCCCTATAATGCGCCACCA CTGACACGGAACAA
rrn A2	GCAAAAAATAAATGCTTTGACTCTGTAG ¥¥CGGGAAGGCGTATTATGC ¥¥ACACC CCGCGCCGCTGAGAA
λ P <sub>R0</sub>	TAAACCCGTGCGTGTTGACTATTTTA ¥CCTCTGGCGGTGATAATGGY ¥TTGCA TGTACTAAGGAGGT
λ P <sub>L</sub>	TATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATA ¥CCACTGGCGGTGATACTGA ¥¥GCACATCAGCAGGACGCAC
T7 A3	GTGAAACA AAACGGTTGACAACATGA ¥AGTAAACACGGTACGATGT ¥ACCACATGAAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGT ¥CTAACCTATAGGATACTTA ¥CAGCCA TCGAGAGGGACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTATTGACAACATGAAGT AACATGCAGTAAGATAC ¥AAATCGCTAGGTAACTACTAG
fd VIII	GACAAAATCTCCGTTGTACTTTGTT ¥¥TCGCGCTTGGTATAATCGYCTGGGGTCA AAGATGAGTG
	-35 -10 +1 →

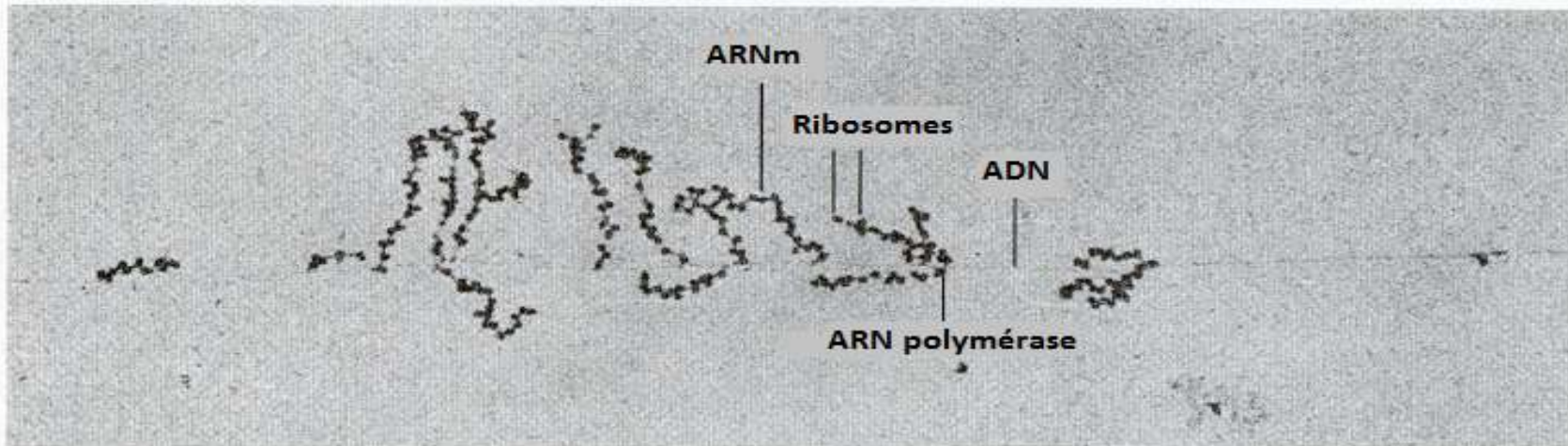
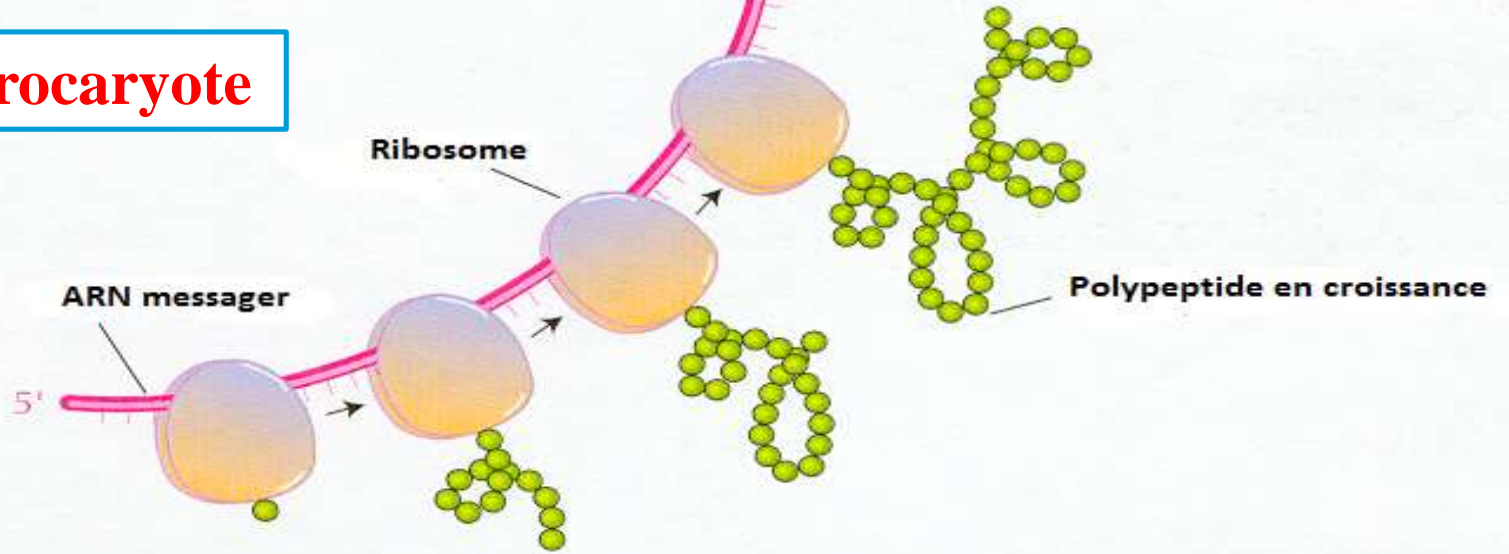
(c) Consensus sequences for all *E. coli* promoters



ADN

ARN polymérase

# ARNm procaryote



7-methylGuanosine

ARNm eucaryote

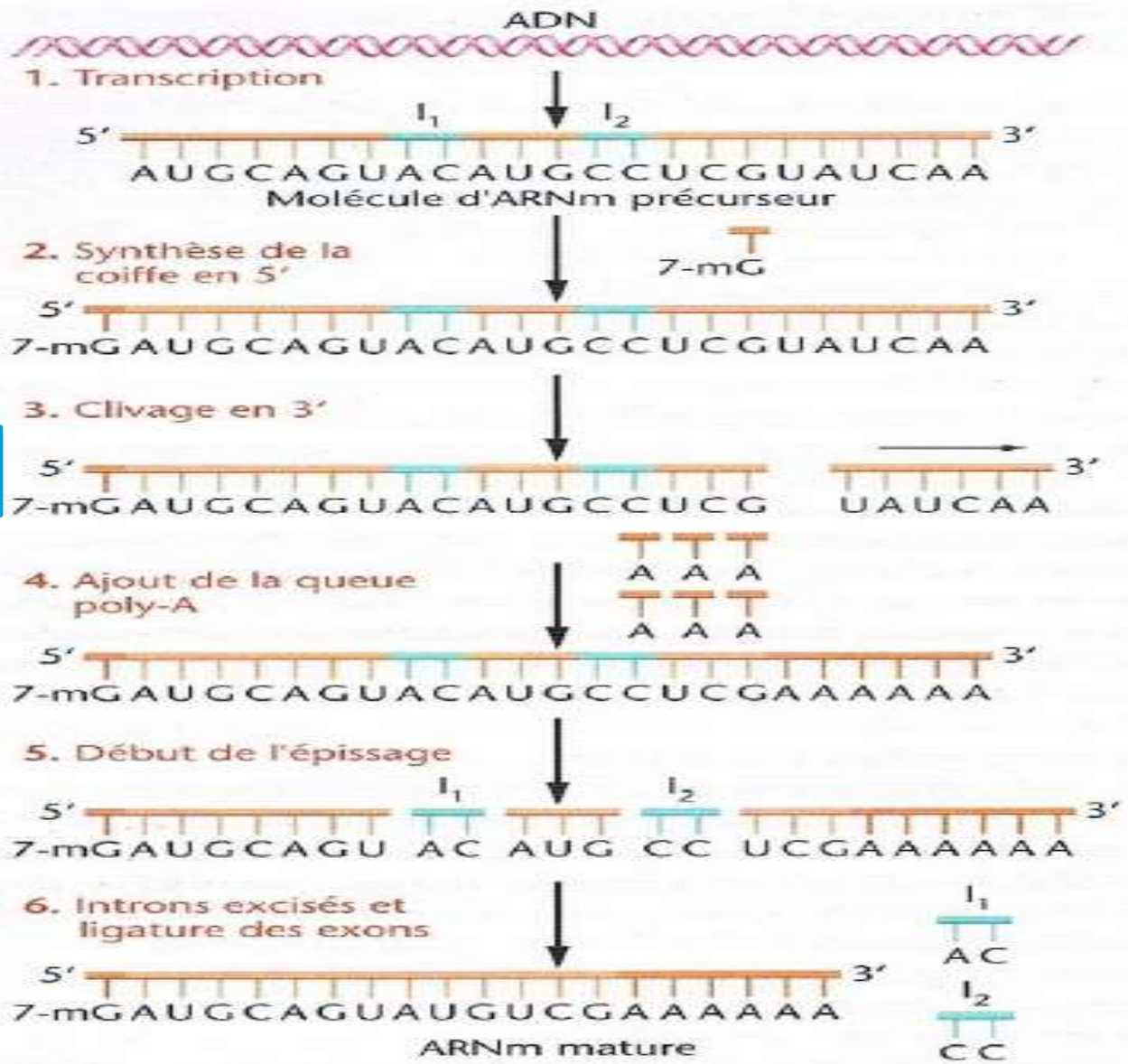
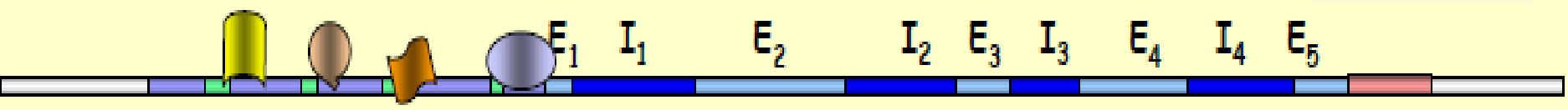


FIGURE 13.10 Modifications post-transcriptionnelles chez les eucaryotes. L'ARN nucléaire hétérogène (ARNnh) est converti en ARNm qui contient une coiffe en 5', une queue poly A en 3' et dont les introns ont été excisés.



Promoteur

Terminaison



Transcription



épissage

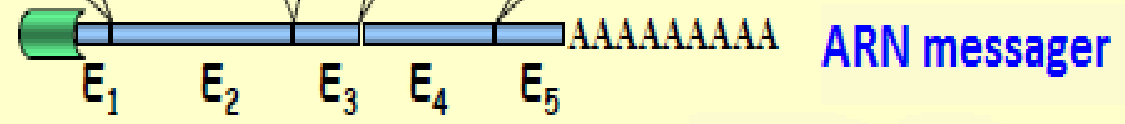
cap

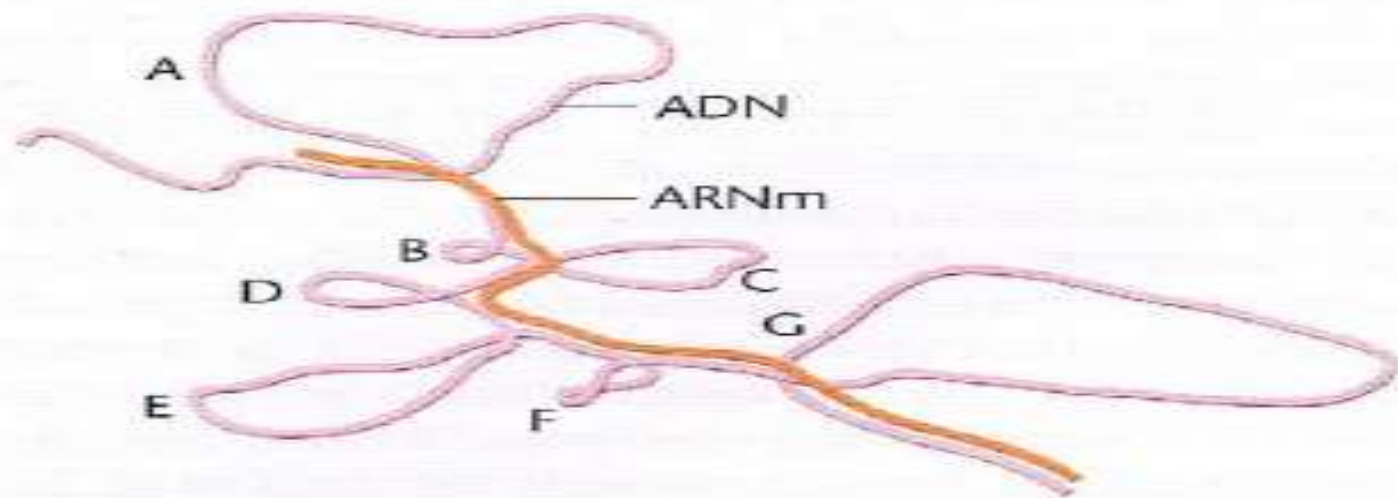
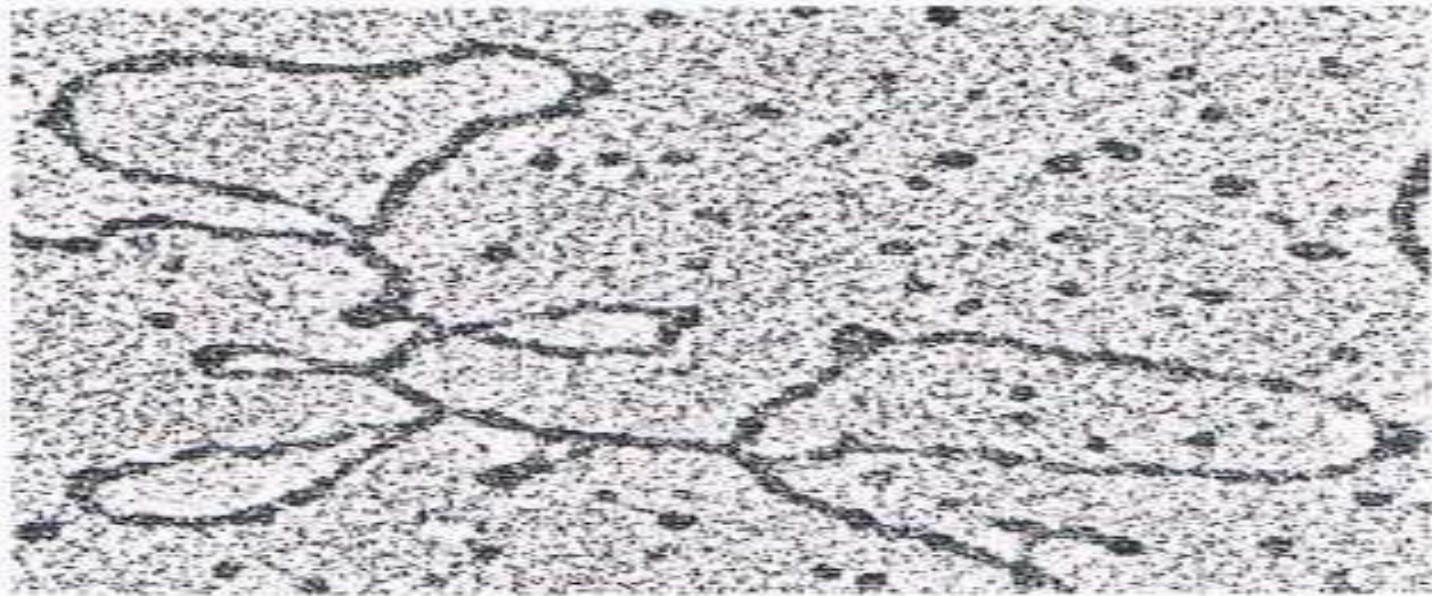
poli-A



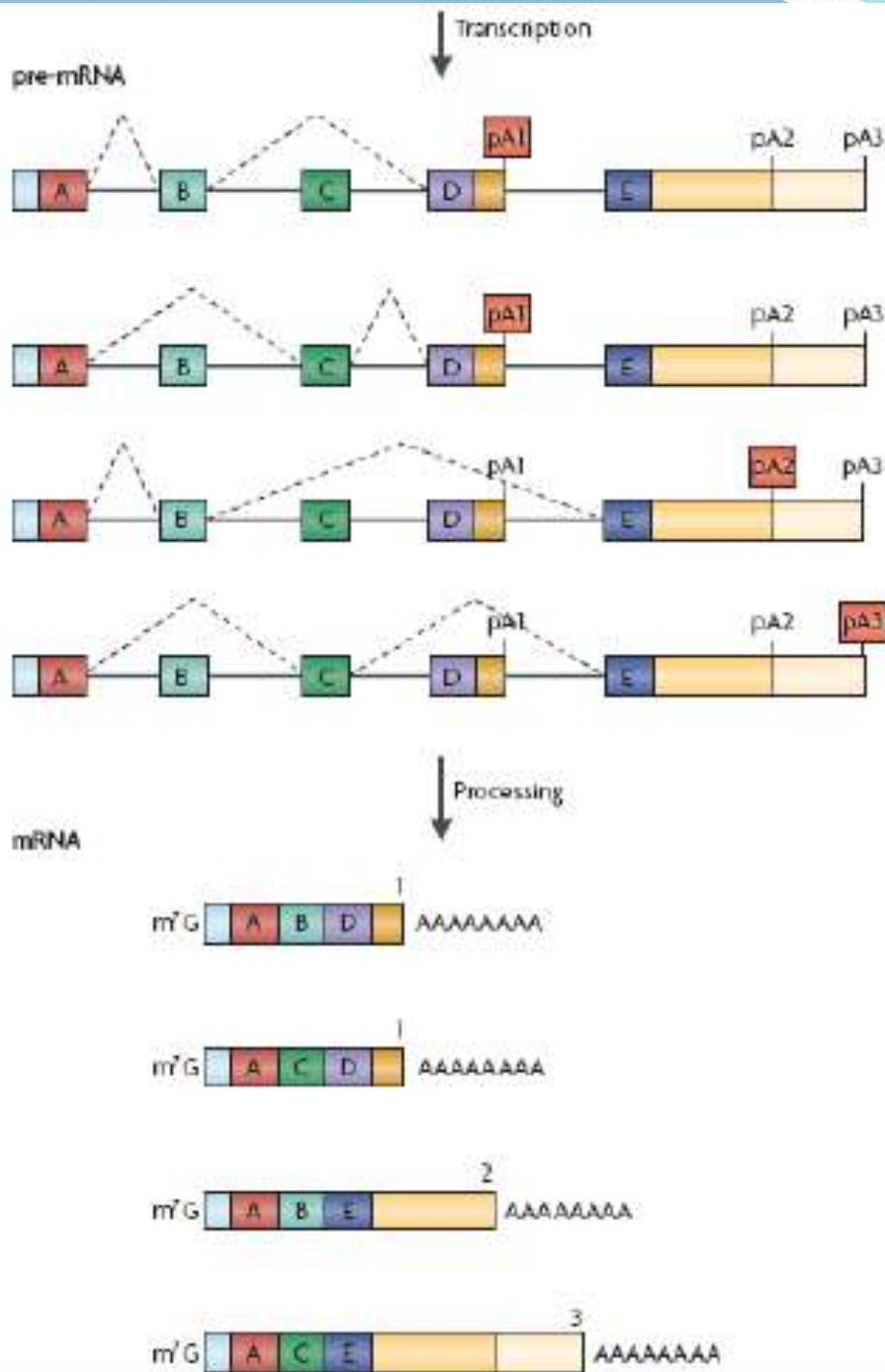
élimination des introns :

splicing





**FIGURE 13.11** Microphotographie électronique et interprétation schématique de la molécule hybride (hétéroduplex) formée par l'ADN du gène codant l'ovalbumine, chez le poulet, et par l'ARNm mature de ce gène. Sept introns de l'ADN, marqués de A à G, génèrent sept boucles d'ADN.



## L'épissage alternatif de l'ARN pré-messager permet à un seul gène de

**codifier plusieurs isoformes:** Les

régions codifiantes alternatives se

forment par épissage en excluant

mutuellement les exons B et C et par

sélection des deux exons terminaux (D

et E). Il est possible d'obtenir une

diversification postérieure par sélection

des sites poly (A) (pA) dans le même

exon terminal (pA2 ou pA3 dans

l'exon E) générant des isoformes avec

une région 3' UTR (three prime

UnTranslated region) plus ou moins

longue.

➤ **L'épissage alternatif** est général chez les eucaryotes supérieurs: jusqu'à 74% des gènes humains multi-exons ont un ou plusieurs épissages alternatifs.

➤ On estime que **l'épissage alternatif** se produit dans un tiers des gènes d'Arabidopsis et du riz, incluant des gènes impliqués dans le contrôle de la croissance et du développement, les réactions de stress et de la signalisation.

➤ Les principaux conséquences de **l'épissage alternatif** sont des changements dans la structure/fonction des protéines et la régulation de l'expression des gènes.

➤ L'inclusion ou l'exclusion des exons ou introns complets, ou une partie d'eux, peut altérer les domaines de protéines, l'activité, l'emplacement, les interactions avec d'autres protéines ou substrats et des modifications post-traductionnelles.

# La Traduction



➤ **La traduction** de l'ARNm est le processus biologique qui permet de polymériser des acides aminés en une chaîne polypeptidique.

➤ Ce mécanisme se fait grâce aux ribosomes qui servent de « robots » non spécifiques.

**Procaryotes**  
Monosome 70S ( $2,5 \times 10^6$  Da)

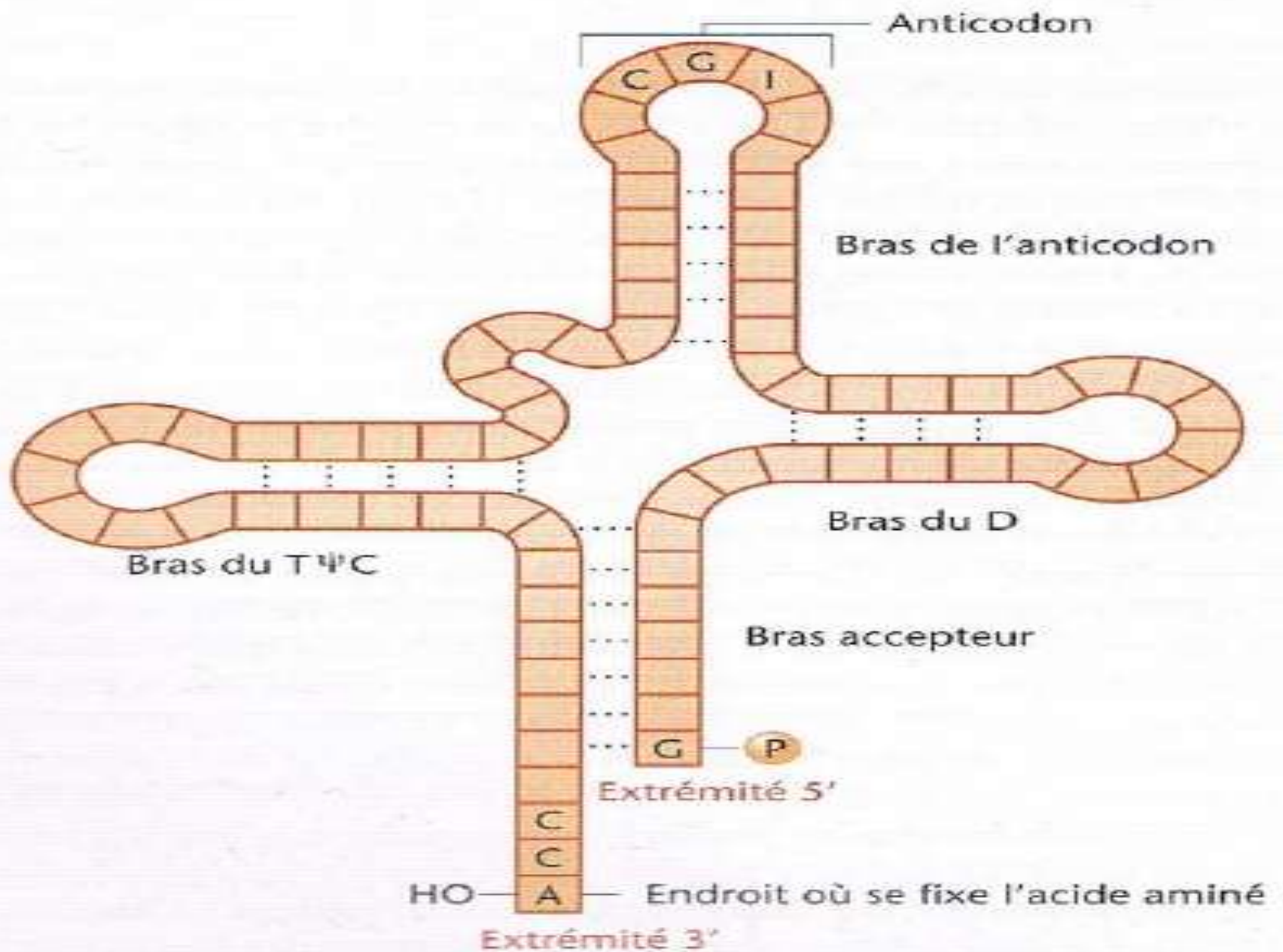


**Eucaryotes**  
Monosome 80S ( $4,2 \times 10^6$  Da)



Grande sous-unité		Petite sous-unité		Grande sous-unité		Petite sous-unité	
50S	$1,6 \times 10^6$ Da	30S	$0,9 \times 10^6$ Da	60S	$2,8 \times 10^6$ Da	40S	$1,4 \times 10^6$ Da
ARNr 23 S (2 904 nucléotides)		ARNr 16 S (1 541 nucléotides)		ARNr 28 S (4 718 nucléotides)		ARNr 18 S (1 874 nucléotides)	
+		+		+		+	
31 protéines		21 protéines		49 protéines		33 protéines	
+		+		+		+	
ARNr 5 S (120 nucléotides)				ARNr 5 S (120 nucléotides) + ARNr 5,8 (160 nucléotides)			

FIGURE 14.1 Composition comparée des ribosomes procaryotes et eucaryotes.



**FIGURE 14.3** Représentation de l'ARN de transfert selon Holley (modèle en deux dimensions dit « en feuille de trèfle »).



Complexes moléculaires intervenant dans le mécanisme



GTP



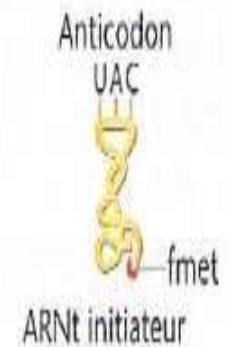
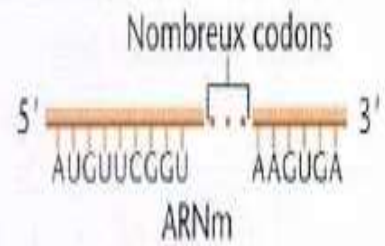
Facteurs d'initiation



Ribosome



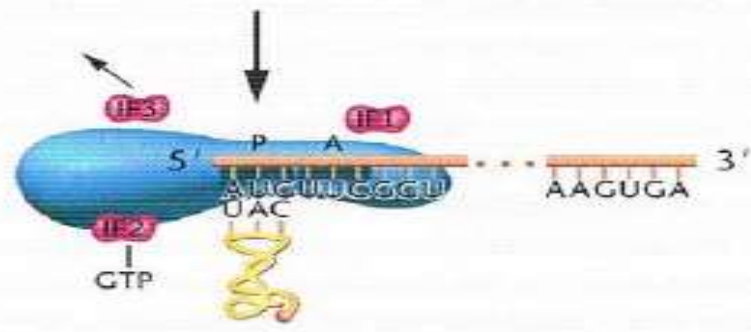
Facteurs d'élongation



Initiation

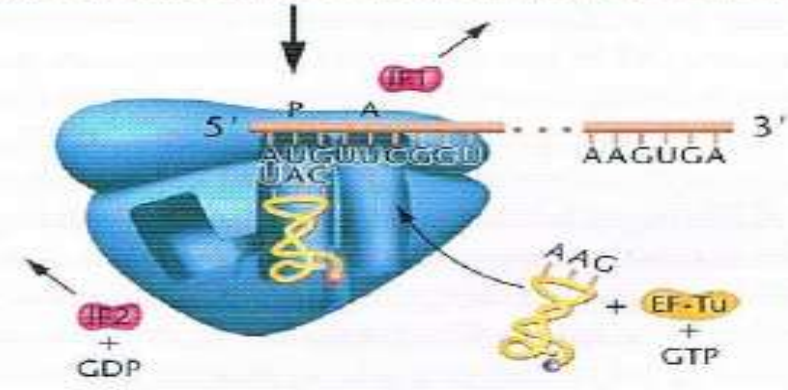


Étape 1 : L'ARNm se lie à fois à la petite sous-unité et aux facteurs d'initiation (IF1, IF2, IF3).



Complexe d'initiation

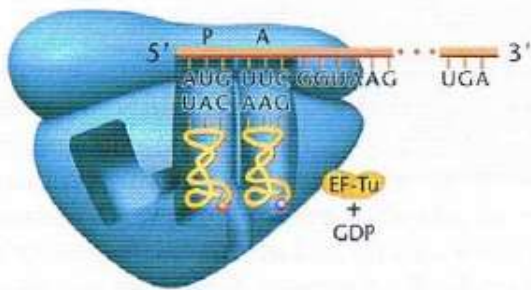
Étape 2 : L'ARN de transfert initiateur <sup>fmet</sup>ARNt se place au site P, face au codon AUG de l'ARNm ; IF3 est relâché



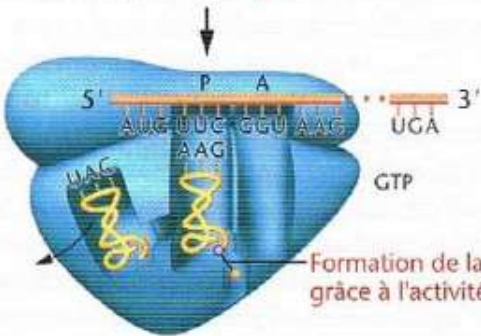
Étape 3 : La grande sous-unité se lie au complexe, IF1 et IF2 sont relâchés ; le facteur EF-Tu complexé au GTP se lie à l'ARNt chargé avec le deuxième acide aminé à incorporer, ce qui facilite l'entrée de cet ARNt chargé sur le site A.

FIGURE 14.6 Mécanisme de l'initiation de la traduction

## Élongation

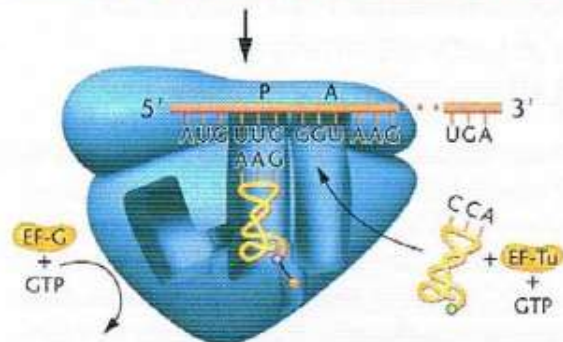


Étape 1 : Le deuxième ARNt chargé de son acide aminé se positionne sur le site A grâce au facteur EF-Tu ; la première étape de l'élongation commence.



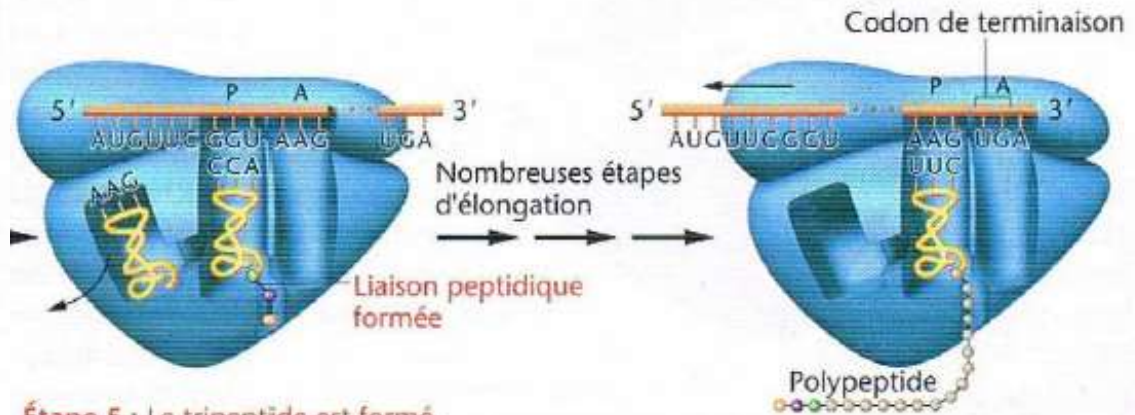
Formation de la liaison peptidique grâce à l'activité peptidyl-transférase

Étape 2 : La liaison peptidique se fait entre la méthionine et le deuxième acide aminé ; l'ARNt non chargé passe du site P au site E et en conséquence l'ARNm est transloqué de trois bases vers la gauche, ce qui déplace l'ARNt portant le dipeptide sur le site P.



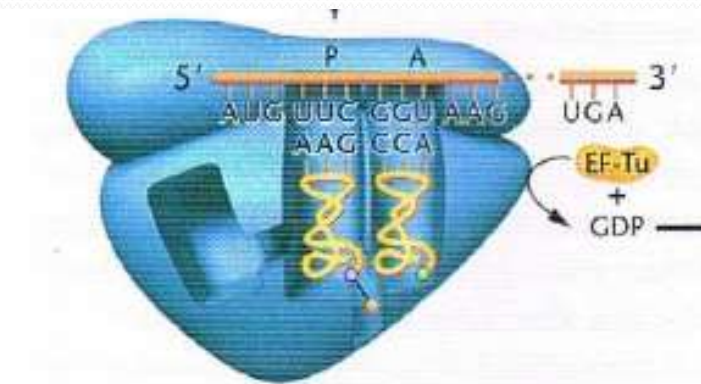
Étape 3 : La première étape de l'élongation est terminée, grâce au facteur EF-G. Le troisième ARNt chargé peut se positionner sur le site A.

## FIGURE 14.7 Élongation de la chaîne polypeptidique durant la traduction.



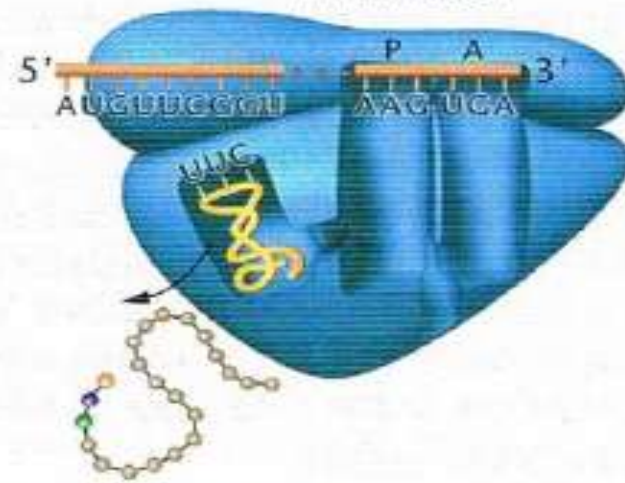
Étape 5 : Le tripeptide est formé, la seconde étape terminée, l'ARNt non chargé migre vers le site E.

Étape 6 : La chaîne polypeptidique est synthétisée et quitte le ribosome.

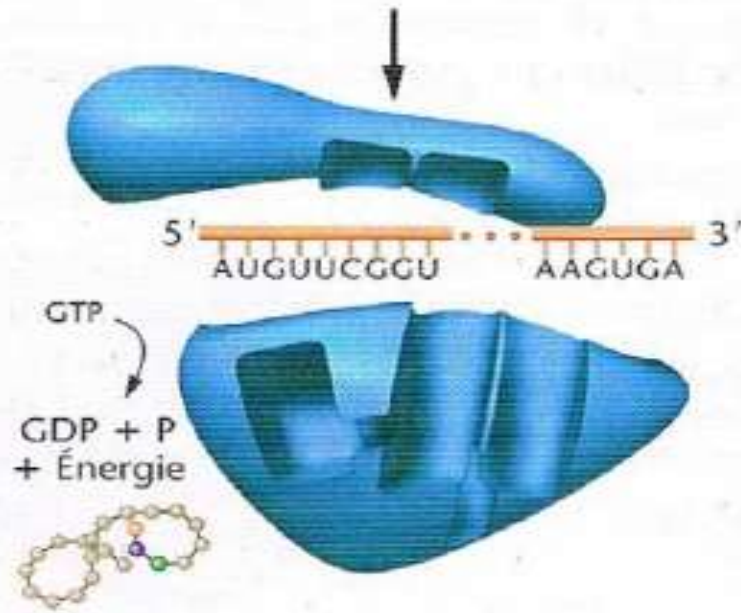


Étape 4 : Le troisième ARNt chargé entre sur le site A, grâce au facteur EF-Tu ; la deuxième étape de l'élongation commence.

## Terminaison



Étape 1 : L'ARNt et le polypeptide sont libérés.



Étape 2 : Les facteurs de terminaison liés au GTP sont activés ; les composants se séparent, le polypeptide prend sa structure tertiaire.

FIGURE 14.8 Terminaison du processus de traduction.

# Ce que vous devez savoir sur les caractéristiques du code génétique

		Seconde position					
		U	C	A	G		
Première position (extrémité 5')	U	UUU <i>phe</i>	UCU	UAU <i>tyr</i>	UGU <i>cys</i>	U	Troisième position (extrémité 3')
		UUC	UCC <i>ser</i>	UAC	UGC	C	
		UUA	UCA	UAA <i>Stop</i>	UGA <i>Stop</i>	A	
		UUG	UCG	UAG <i>Stop</i>	UGG <i>trp</i>	G	
	C	CUU <i>leu</i>	CCU	CAU <i>his</i>	CGU	U	
		CUC	CCC <i>pro</i>	CAC	CGC	C	
		CUA	CCA	CAA <i>gln</i>	CGA	A	
		CUG	CCG	CAG	CGG	G	
	A	AUU	ACU	AAU <i>asn</i>	AGU <i>ser</i>	U	
		AUC <i>ile</i>	ACC <i>thr</i>	AAC	AGC	C	
		AUA	ACA	AAA <i>lys</i>	AGA <i>arg</i>	A	
		AUG <i>met</i>	ACG	AAG	AGG	G	
	G	GUU	GCU	GAU <i>asp</i>	GGU	U	
		GUC <i>val</i>	GCC <i>ala</i>	GAC	GGC	C	
		GUA	GCA	GAA <i>glu</i>	GGA	A	
		GUG	GCG	GAG	GGG	G	

AUG Initiation   
 UAA Terminaison

**FIGURE 13.7** Le code génétique. AUG code la méthionine, qui initie la plupart des chaînes polynucléotidiques. Tous les autres acides aminés, excepté le tryptophane qui est seulement codé par UGG, sont codés par deux à six codons. Les codons UAA, UAG et UGA sont des codons stop et ne codent aucun acide aminé.

- Le code génétique est écrit sous forme linéaire et utilise comme lettres les bases ribonucléotidiques qui constituent la molécule d'ARNm. La séquence ribonucléotidique est définie par les bases nucléotidiques complémentaires de l'ADN.
- Chaque « mot » de l'ARNm contient trois lettres ribonucléotidiques. Chaque groupe de *trois* ribonucléotides, appelé **codon**, spécifie *un* acide aminé.
- Le code **n'est pas ambigu**, c'est-à-dire que chaque codon spécifie un seul acide aminé.
- Le code est **dégénéré**, c'est-à-dire qu'un acide aminé donné peut être spécifié par plus d'un codon. C'est le cas pour 18 des 20 acides aminés.
- Le code contient des signaux « début » et « fin », ce sont les codons nécessaires à l'**initiation** et à la **terminaison** de la traduction.
- Aucune ponctuation interne (« virgule ») n'est utilisée dans le code génétique. Le code est donc dit « **sans virgule** ». Une fois la traduction des ARNm commencée, les codons sont lus les uns après les autres sans discontinuité.
- Le code n'est pas **chevauchant**. Après le démarrage de la traduction, chaque nucléotide situé dans l'ARNm, quelle que soit sa situation, fait partie d'un seul codon.
- Le code est presque **universel**. À quelques exceptions près, un dictionnaire unique est utilisé par la plupart des virus, des procaryotes, des archéobactéries et des eucaryotes.



## **2- Le clonage**

# *Qu'est-ce qu'un clone ?*

- ❖ En biotechnologie, le clonage désigne la reproduction en laboratoire de gènes, cellules ou organismes à partir d'une même entité originale.
- ❖ Le terme « clone » désigne un objet ou un organisme considéré comme identique à un autre.
- ❖ Dans le monde végétal, les boutures, les greffes, les pousses, ... sont toutes des manières de produire des exemplaires d'une même espèce à base d'une seule cellule.

Le clonage humain naturel existe depuis le début de l'humanité: ce sont les jumeaux monozygotes (appelés vrais jumeaux, qui proviennent du la même œuf fécondé qui, après division en deux cellules filles génétiquement identiques, se sépare totalement et ont continué leur développement individuellement)



# *Le processus*

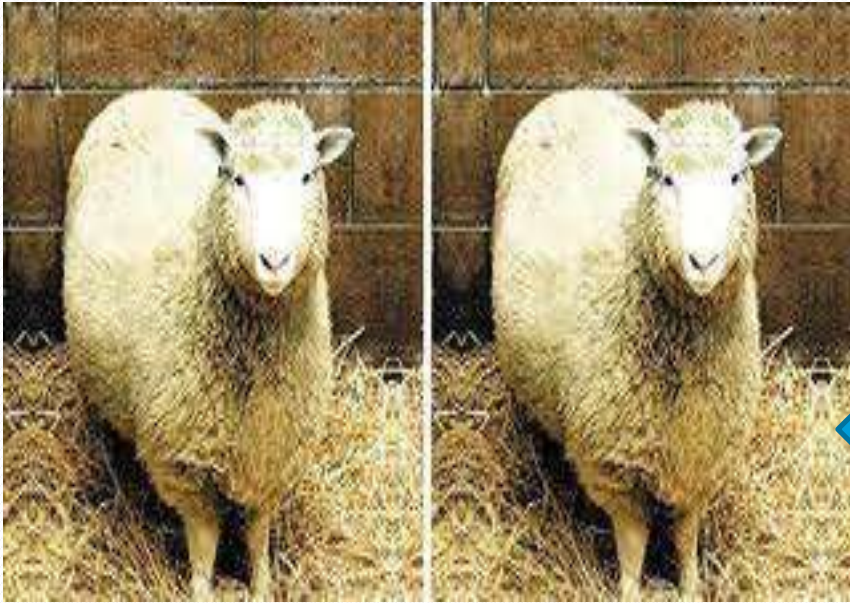
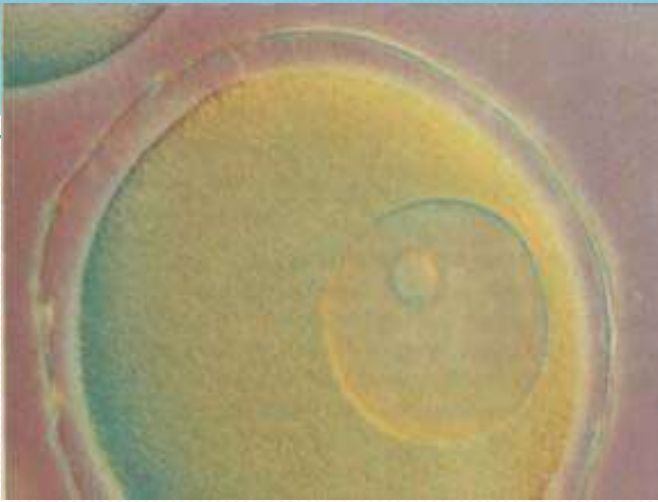
## *Pour cloné un animal?*

- On prend un œuf non fertilisé, on enlève le noyau =(cellule énucléée).
- On prend un œuf fertilisé, il entre dans le premier stade de développement; la mitose, les cellules se séparent, le noyau est transféré.
- La cellule qui contient le noyau transplanté commence la mitose et l'œuf fécondé entre en première stade de développement et est implantée dans un organisme adulte qui sera porteuse.



Un organisme copie exacte de son parent



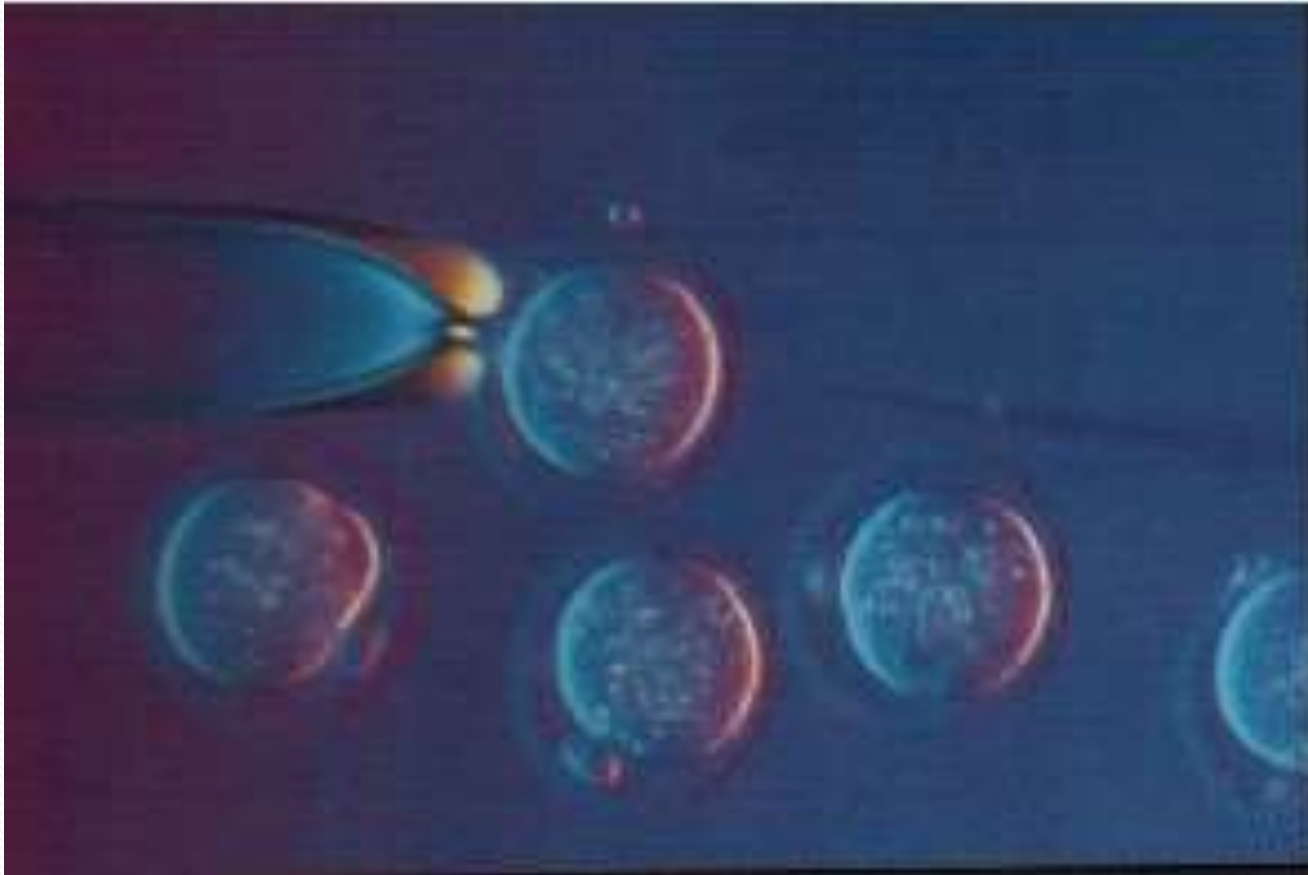


Le clonage est donc une forme de reproduction asexuée ( le processus par lequel des cellules identiques sont formées à partir d'une simple cellule ou d'un tissu).

## **L'inconvénient**

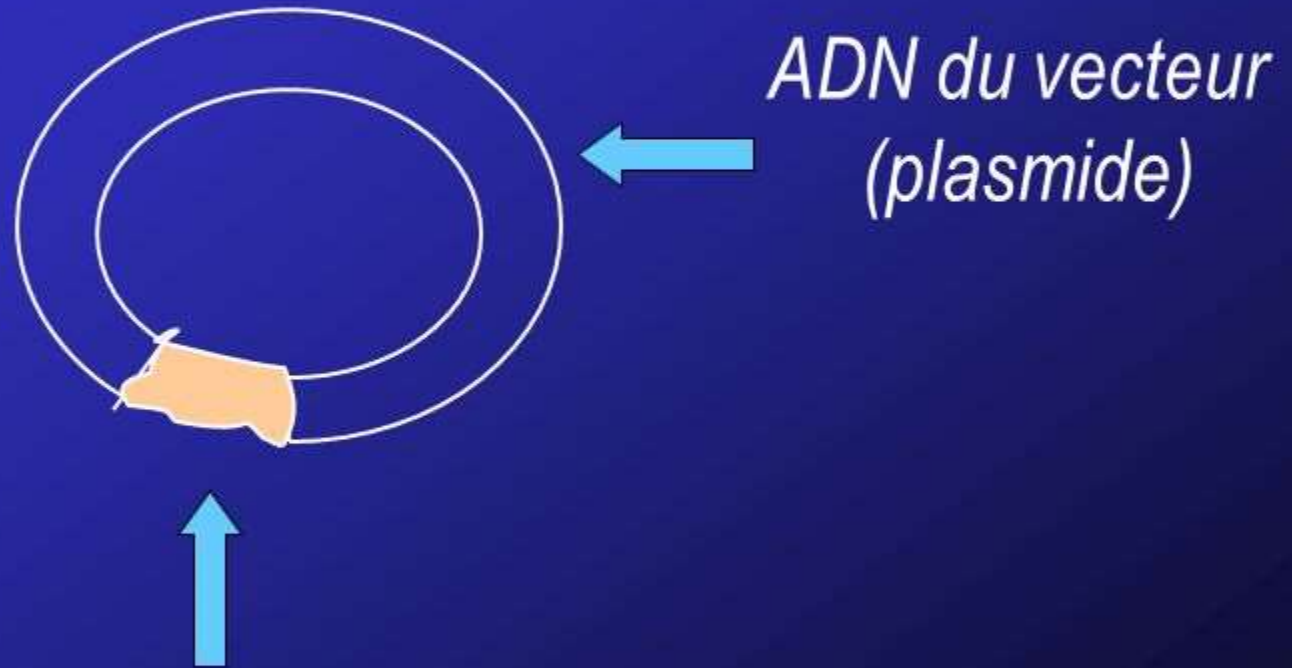
**Le clonage n'offre aucune variation génétique qui permet à une espèce de s'adapter à leur environnement et d'évoluer.**

# Comment introduire un gène étranger dans une autre espèce?

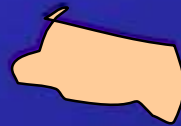


# Étape 1

*Introduire l'ADN étranger dans le vecteur*



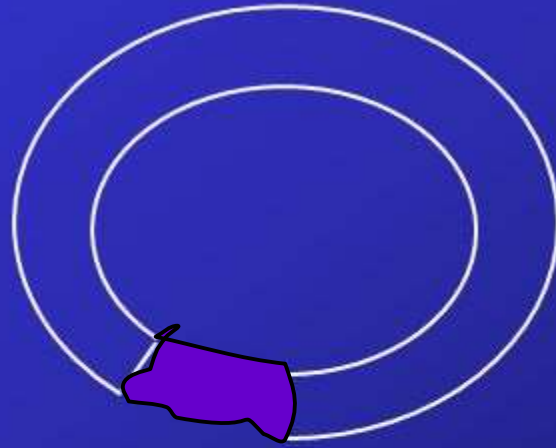
*Site de polyclonage servant  
à insérer l'ADN étranger.*



**Enzyme de  
restriction  
(coupe une partie  
spécifique de l'ADN  
du vecteur)**



*ADN étranger  
(lié à l'aide d'une  
enzyme de liaison)*



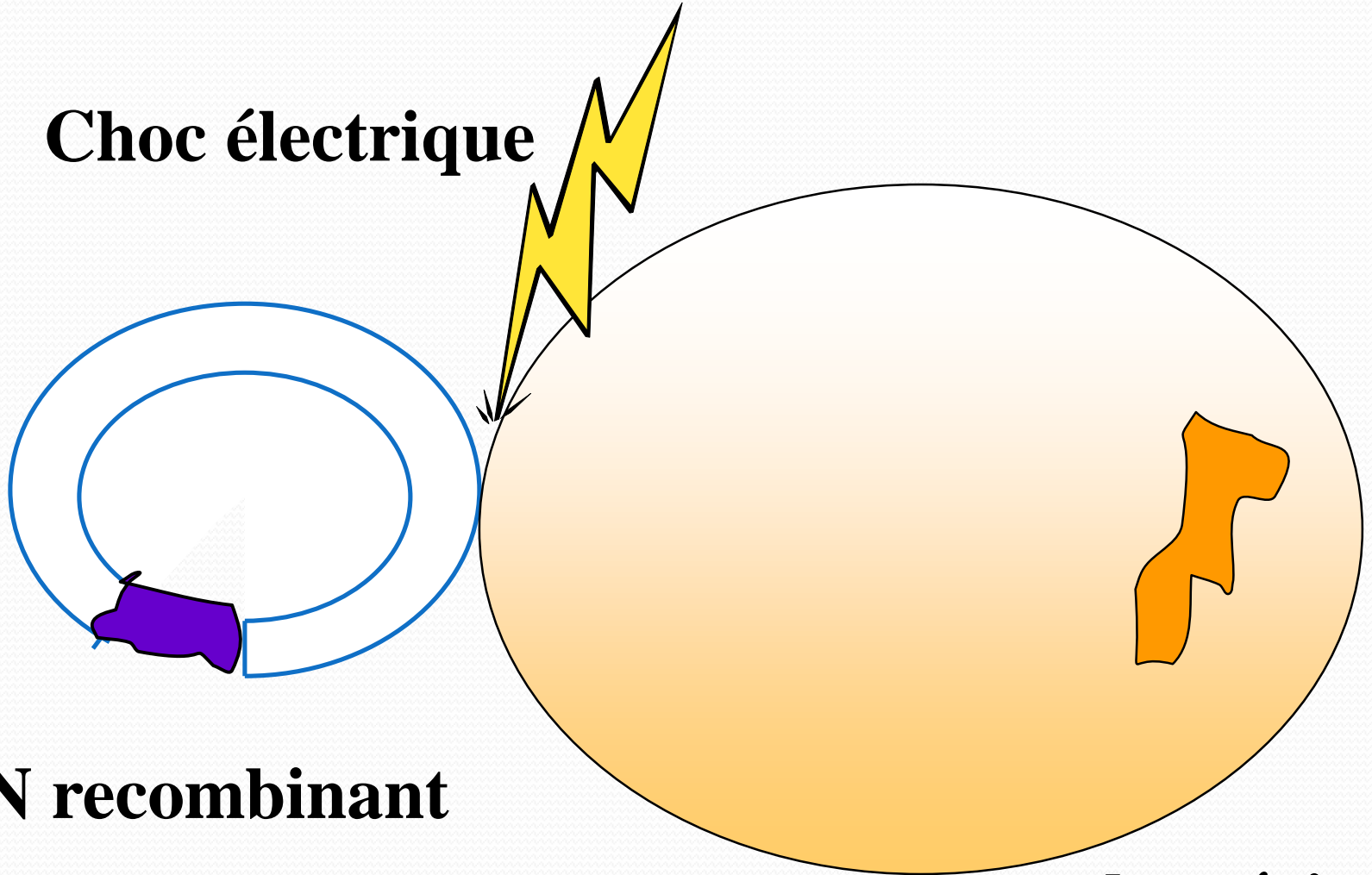
ADN recombinant

(ADN vecteur + ADN étranger)

# Étape 2

*Introduire l'ADN recombinant dans une bactérie*

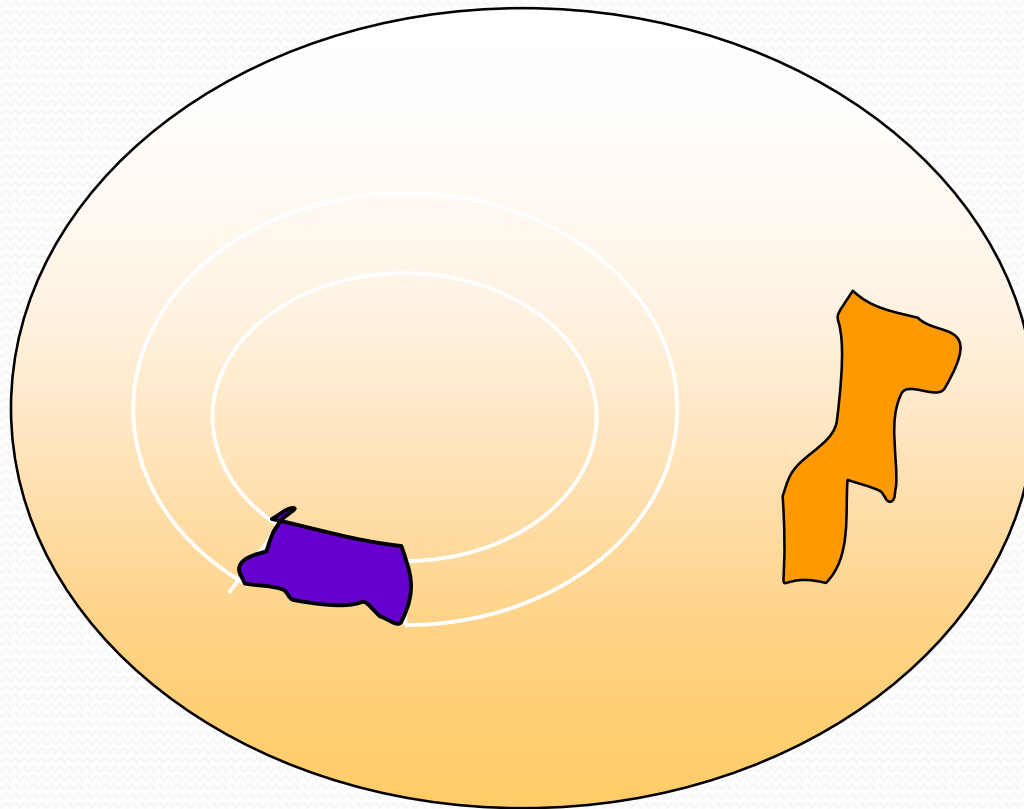
**Choc électrique**



**ADN recombinant**

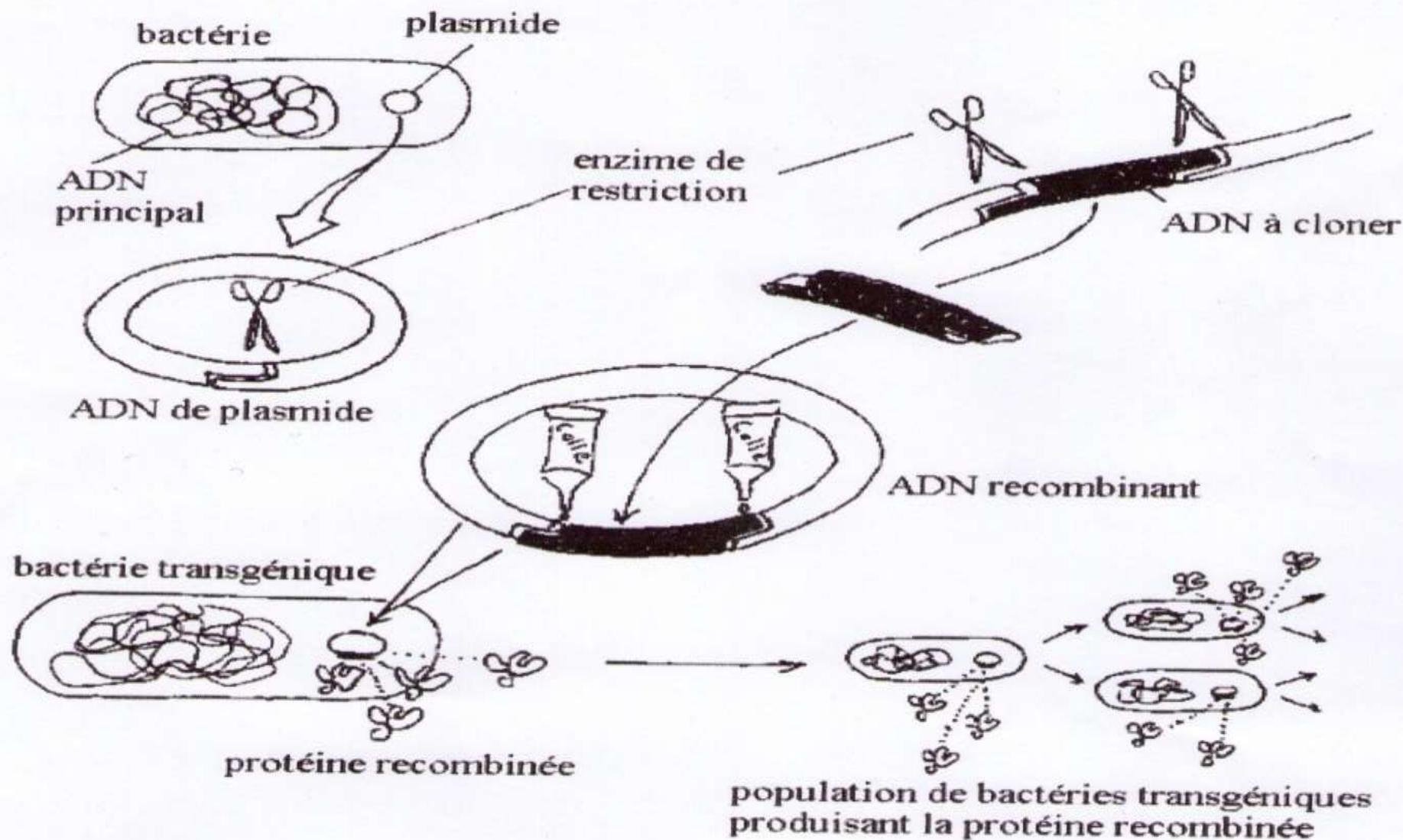
**bactérie**





**bactérie transformée**

# 1) La manipulation génétique :





# **Enzymes de restriction et de ligation**

# Les enzymes

## 1- Les enzymes qui coupent l'ADN

- Les enzymes de restriction

- La Dnase (Les nucléases)

## 2- Les enzymes qui ligaturent

- La ligase

Pour le clonage d'un gène, il faut obtenir un l'ADN pure et construire une nouvelle molécule d'ADN recombinée;

Pour cela, il est nécessaire de couper les molécules d'ADN en des sites spécifiques (*enzymes de restrictions*)

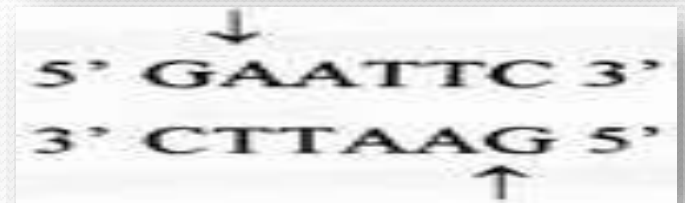
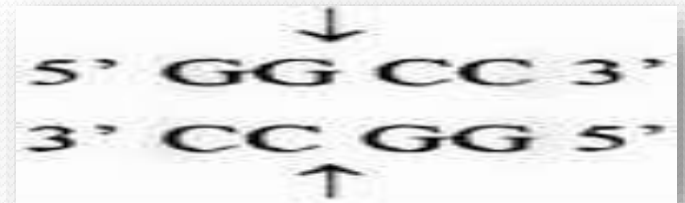
Pour les fusionner de façon contrôlée (*enzymes de ligations*).

# Les enzymes qui coupent l'ADN

## A- Enzyme de restriction

- ✓ Isoler de micro organismes (B\*)
- ✓ Couper l'ADNdb en des séquences spécifiques = palindrome

- ✓ Coupure → franche
- ✓ Coupure → cohésive



- ✓ Conditions opératoires (T°, force ionique)



## *Les nucléases*

Les nucléases dégradent les molécules d'ADN en rompant les liaisons phosphodiester liant un nucléotide au suivant.

Il existe 2 types de nucléases.

## B- La Dnase

- ✓ endonucléase
- ✓ Coupe l'ADN db et sb au hasard
- ✓ Origine bovine (pancréas)
- ✓  $Mn^{++}$                       les 2 brins au m endroit
- $Mg^{++}$                       chaque brin indépendamment

## c – La nucléase

- ✓ Attaque l'ADN sb
- ✓ Isoler d'*Aspergillus oryzae*



# *Ligases*

L'ADN ligase répare les discontinuités qui peuvent apparaître dans un ADN double brins, notamment lors de la réplication. Il permet de relier les 2 fragments d'ADN double brins (enzyme capitale puisqu'elle permet la construction de molécules d'ADN recombinées).

## **ADN ligase**

L'enzyme n'agit que si les 2 ADN sont associés par des extrémités cohésives. Cette ligase assure la formation des liaisons phosphodiester entre une extrémité 3'OH et une extrémité 5' phosphate.

## **T4 ADN ligase**

Elle est capable d'effectuer des ligations entre 2 ADN à bouts francs.



# **Vecteur de clonage et d'expression**

## *Il existe 2 catégories de vecteurs:*

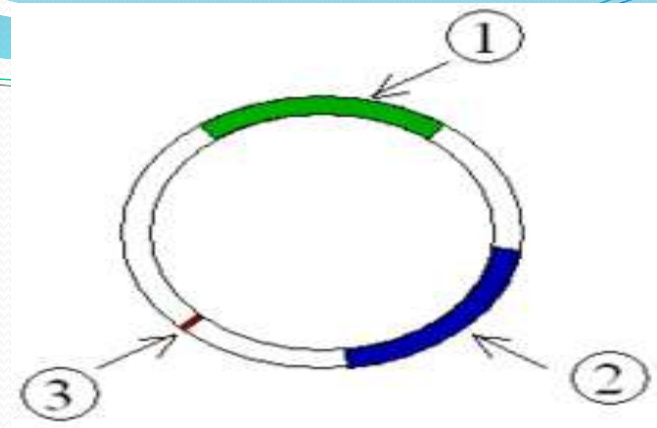
*Vecteur de clonage:* Destine a isoler physiquement un fragment d'ADN et a amplifier le nombre de copies.

*Vecteur d'expression:* Destine a transférer un gène et le faire exprimer dans une cellule hôte qui n'est pas sa cellule d'origine.

# *Différents vecteurs de clonage*

*et d'expression:*

## *1. Les plasmides*



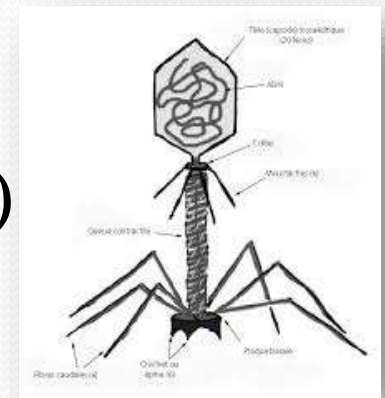
C'est une petite molécule d'ADN circulaire possédant son propre système de réplication. Il est présent chez les bactéries et la levure *Saccharomyces cerevisiae* (« plasmide 2 $\mu$  »).

## 2. Les phages:

Les vecteurs phagiques présentent 2 avantages essentiels par rapport aux vecteurs plasmidiques:

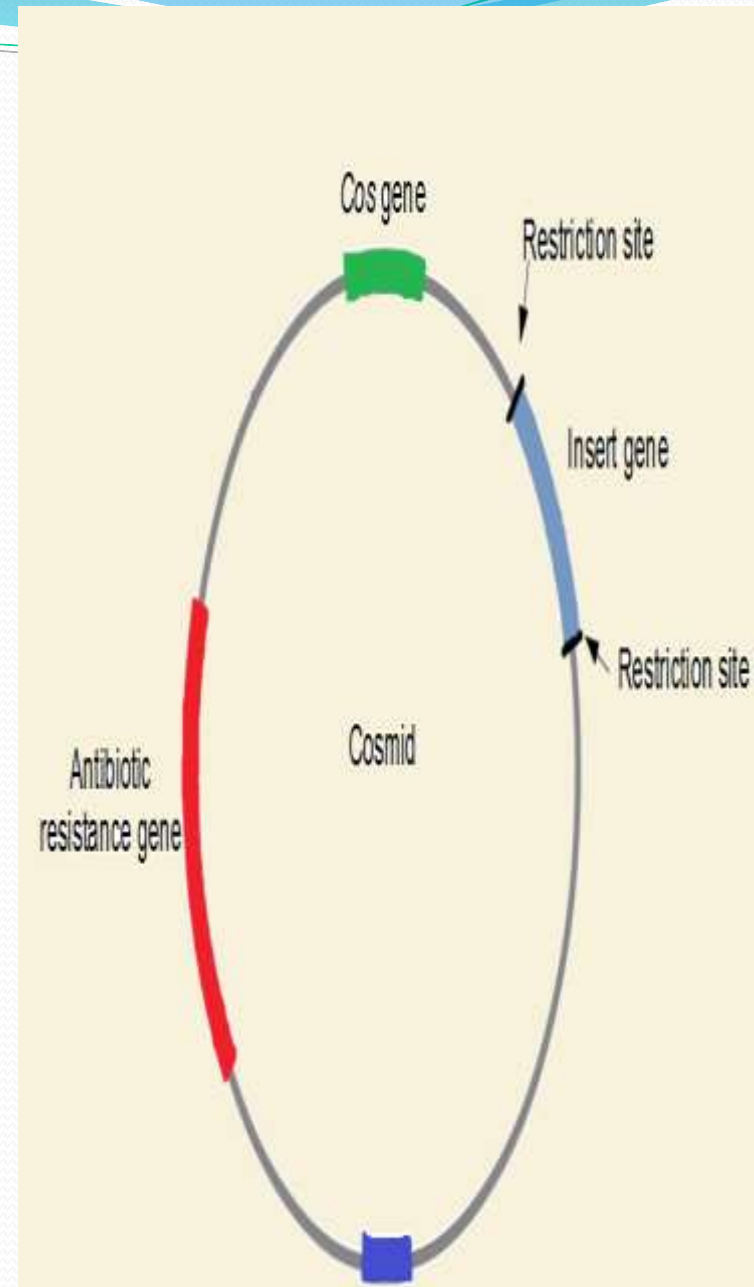
❑ Taille de l'insert plus grande (12 a 22kb)

❑ Infection (pénétration de l'ADN) spontanée des cellules bactériennes.



### 3. *Les cosmides:*

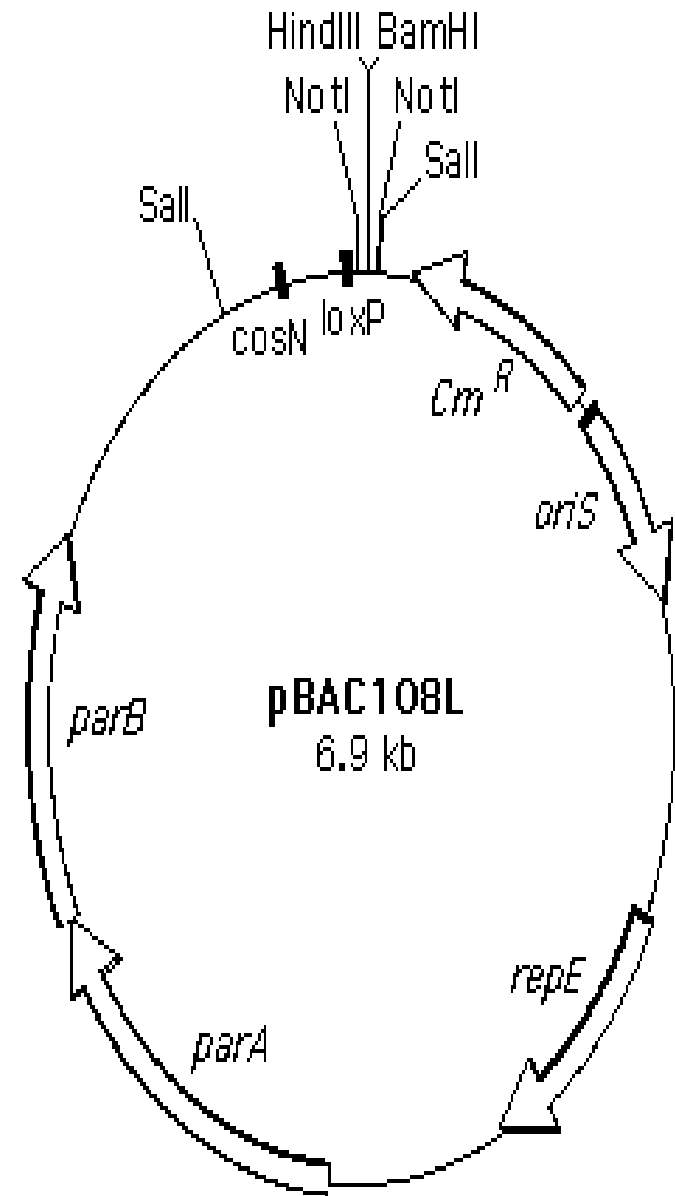
Vecteurs totalement artificiels construits à partir d'un plasmide auquel on a ajouté les séquences cos du phage  $\lambda$ . Cet ADN est ensuite encapsidé comme pour les vecteurs phagiques.



## 4. Chromosome Artificiel

### *Bactérien (BAC):*

C'est un vecteurs servant a cloner de grands fragments d'ADN (100 a 300kb) dans une cellule d'E. coli.



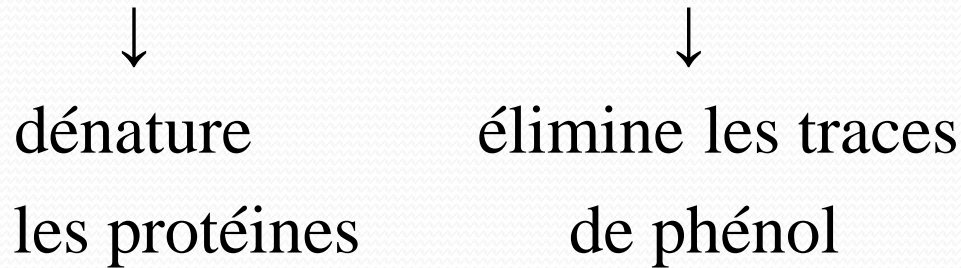


# **Les techniques de préparation de l'ADN**



## L'ADN génomique

- ✓ Destruction des membranes: SDS et/ou broyage ds de l'azote liquide
- ✓ Purification: élimination des protéines cellulaires par la protéinase K+ EDTA (inhibiteurs des nucléases cellulaires)
- ✓ Extraction au phénol/ chloroforme:



l'ADN est ds la phase aqueuse

- ✓ Précipitation avec l'éthanol froid → récupération de la méduse d'ADN





20180920\_105351.mp4

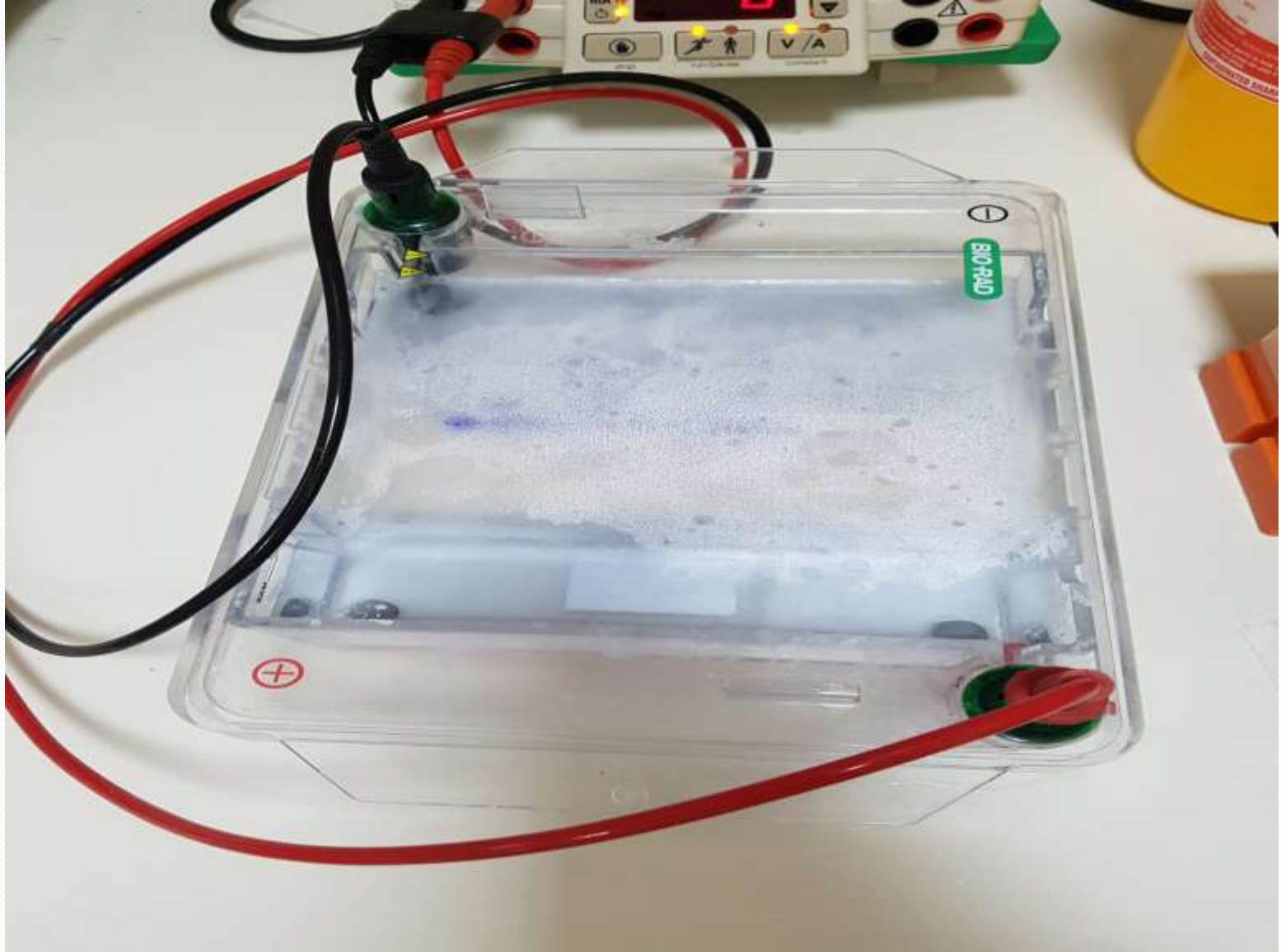
# L'électrophorèse sur gel d'agarose

- ✓ L'agarose =
  - ✓ polysaccharide dérivant d'une algue
  - ✓ Forme purifiée de l'agar
  - ✓ Il forme un gel solide ds une solution Aqueuse
- ✓ Les prélèvements d'ADN sont placés ds des puits à la surface du gel d'agarose
- ✓ un champs électrique est appliqué au gel en présence d'une solution tampon conduisant l'électricité



Migration des fragments d'ADN vers l'électrode + à une vitesse qui dépend de leurs tailles et de leurs formes

L'ADN étant coloré par le BET → il apparait en bande orange à l'UV





# **Les banques d'ADN**

# I- Banque de gènes

- ✓ = Collection de  $\neq$  séquences d'ADN d'un O\* dont chacune a été cloné ds un vecteur
- ✓ besoin: purification, stockage, analyse
- ✓ 2 types de banques d'ADN:
  - ✓ Banque d'ADN complémentaire
  - ✓ Banque d'ADN génomique

# Banque d'ADN génomique

## 1/ Construction

### a- Purification d'ADN

- ADN des eucaryotes
  - ❖ Préparation des N\*
    - ❖ Elimination des protéines , lipides et autres macromolécules (protéase, extraction phénol-chloroforme)
- ADN des procaryotes
  - ❖ Extraction directe



## b- fragmentation aléatoire de l'ADN

- Cisaillement physique:

(Pipetage, Mixage, ultrasons) fractionnera progressivement l'ADN → pts fragments au hasard → extrémités franches

- Digestion partielle

Utilisation de quantité limitée d'enzyme de restriction en un tps limité (ne va pas couper ds ts les sites de reconnaissance) → molécules de taille + gde que celles complètement digérées

## 2/ Clonage ds des vecteurs

- Des plasmides, phages, cosmides, YAC sont utilisés;
- Le choix dépend de la taille du fragment inséré;
- Ligation par la ligase T4;
- Empaquetage et propagation pour créer une banque.

## II- BANQUE D'ADN COMPLEMENTAIRE

### 1- Préparation

✓ ARNm des eucaryotes (la partie transcrite du génome) → ADNc (pas d'introns)

→ exprimer la protéine encodée ds *E. coli*

✓ Chaque type de  $\phi$  ou tissu exprime des gènes spécifiques → le choix du tissu facilite le clonage

❖ Chez les eucaryotes, ARN est polyadénylé → isolement des ARNm des  $\phi$  lysées en utilisant des billes magnétiques contenant des oligo T  
→ attachement de l'ARNm à l'oligoT via sa queue polyA

❖ Intégrité de l'ARNm peut être vérifiée par traduction de l'ARNm (cellulaire ou acellulaire) ou par électrophorèse

## **2- synthèse de l'ADNc**

✓ Technique de la nucléase S1

✓ Technique de GULBER ET HOFFMAN

✓ ....

### 3- Traitement des extrémités

Pour éviter la ligation d'une extrémité franche de l'ADNc à un vecteur → ajout de linker → extrémités collantes

✓ Utilisation des nucleases S1 → enlever les extrémités qui dépassent;

✓ Enzyme de klenow → remplir des nts oubliés

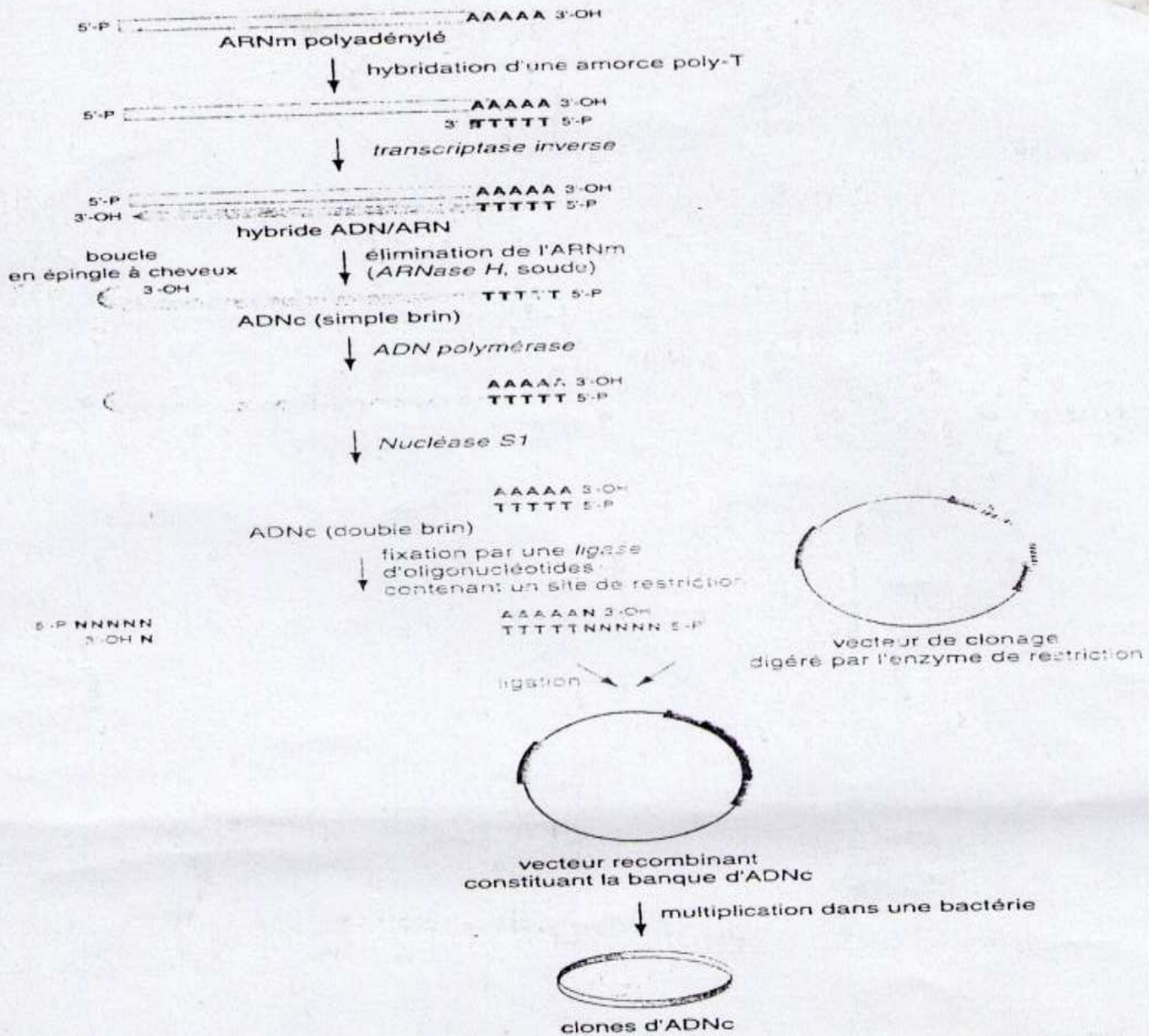
NB: Si le linker est un site de restriction déjà existant sur l'ADNc  
→ méthylation avant l'ajout du linker

✓ Ajout du linker à chaque extrémité franche l'ADNc

✓ Digestion avec l'enzyme de restriction → extrémités cohésives  
prête à la ligation au vecteur

## 4- Ligation à un vecteur

- ✓ Vecteur habituellement déphosphorylé
- ✓ Plasmides et phages sont utilisés
- ✓ Le plus utilisé:  $\lambda$ gt11



synthèse, construction d'une banque d'ADNc

# III- CRIBLAGE DES BANQUES

- ❖ = Permet d'isoler un clone d'une banque génique en utilisant une sonde nucléique pour hybridation
- ❖ la sonde se liera à sa séquence complémentaire (parmi des milliers) permettant l'identification du clone requis



# *Les sondes nucleotidiques*

Segment d'AN utilisé pr repérer le fragment recherché par hybridation moléculaire

## Caractéristiques

- ✓ 1 segment d'AN obligatoirement sb
- ✓ Complémentaire et antiparallèle au fragment recherché qui doit être aussi sb
- ✓ Hybride entre ADN/ADN, ADN/ARN, ARN/ARN


✓ +/- longue selon les cas: elle peut couvrir une partie ou la totalité du fragment recherché

✓ la sonde doit être repérable

chaude (radioactive) dangereuse → tendance à

utiliser des sondes froides (fluorescence, luminescence, coloration,....)

Ex: digoxigenine (DIG) un stéroïde détecté par Ac lié à une enz qui catalyse la formation d'un produit coloré



# **1- Méthodes d'étude de l'ADN**



# **Le Séquençage**

# *Séquençage d'ADN*

2 méthodes ont été développées pour déterminer la séquence en nucléotides des molécules d'ADN

- Méthode de SANGER: terminaison de chaînes par un didésoxyribonucléoside triphosphate (ddNTP)
- Méthode MAXAM et GILBERT: dégradation chimique

## **Méthode de sanger:**

C'est actuellement la technique enzymatique la plus utilisée pour effectuer le séquençage de l'ADN

### **Principe**

Synthèse d'un brin radioactif et complémentaire au brin dont on veut déterminer la séquence

### **Originalité**

- ✓ Utilisation de ddNTP
- ✓ Le brin d'ADN à séquencer soit inséré ds M13 ou pUC  
(M13: bactériophage et pUC: plasmide)

## Rôle du ddNTP

- ✓ Un ddNTP est un analogue structural du dNTP, mais il ne possède pas de gpt OH en 3'
- ✓ Il s'incorpore normalement ds une chaine en cours de synthèse
- ✓ Mais l'extension de la chaine est stoppée aussitôt après son incorporation

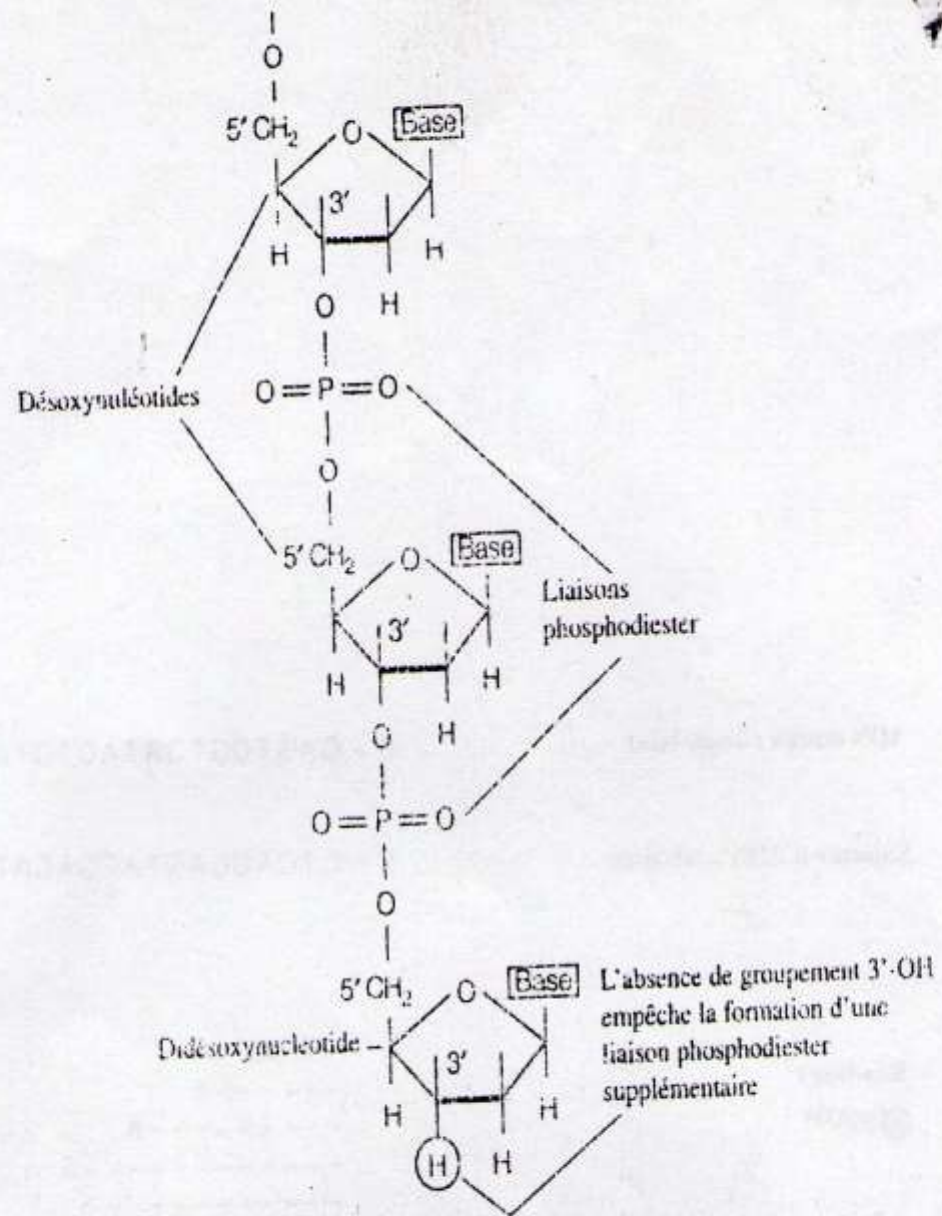


Fig. 1 Terminaison de la synthèse d'ADN par des didésoxynucléotides.



# La réaction de séquençage

## A/ la réaction enzymatique

La réaction s'effectue en traitant de manière parallèle 4 tubes contenant chacun:

- Le brin d'ADN inséré ds M13
- Une amorce universelle
- 4 dNTPs (1 est radioactif ex dATP\*)
- 1 ddNTP ( un ds chaque tube)

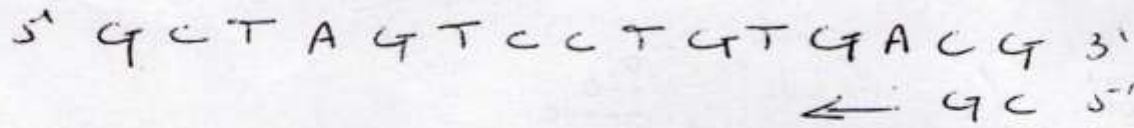
## L'ADNpol a le choix entre:

- ✓ Incorporer un dNTP → la réaction continue
- ✓ ou un ddNTP → la réaction s'arrête

### *Résultat:*

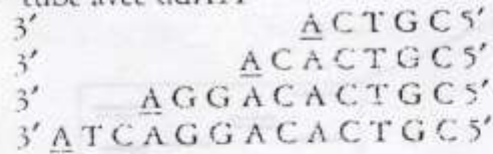
- Mélange de fragments de longueurs  $\neq$ , tous se terminent par ddNTP
- Tous les fragments seront radioactifs incorporation d'un dATP radioactif au cours de leurs synthèse
- Les tous premiers petits fragments (qui n'ont pu incorporer un dATP\*) échappent à l'identification

Prendons pour simplifier, l'exemple d'un segment de 15 nt

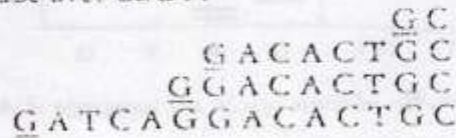


Dans l'exemple choisi, il y aura dans le tube A, des fragments stoppés en face du 1<sup>er</sup> T situé sur le brin à séquencer, formés donc de 5 nucléotides, d'autres stoppés en face du 2<sup>e</sup> T, ayant donc 7 nucléotides, etc.  
 Le même raisonnement s'applique aux 3 autres tubes, ce qui donne finalement pour chacun des 4 tubes :

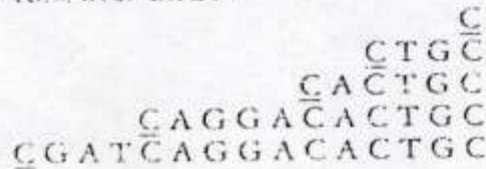
1<sup>er</sup> tube avec ddATP



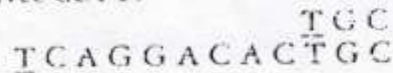
2<sup>e</sup> tube avec ddGTP



3<sup>e</sup> tube avec ddCTP



4<sup>e</sup> tube avec ddTTP



Tous les fragments seront radioactifs car ayant incorporé des dAMP radiomarqués à partir de [<sup>32</sup>S] dATP au cours de leur synthèse. Évidemment les tous premiers petits fragments (qui n'ont pu incorporer d'AMP radioactif) échappent à cette identification.

Fig 2: séquençage par la méthode de Sanger

ADN matrice (simple brin)

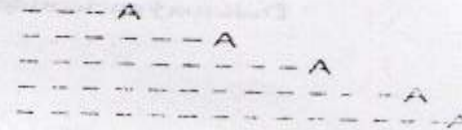
3' - GAGTGGTCATACTGTA - 5'

Séquence d'ADN synthétisée

5' - CTCACCAGTATGACAT - 3'

Réaction 1

⊕ ddATP



Réaction 2

⊕ ddTTP



Réaction 3

⊕ ddGTP



Réaction 4

⊕ ddCTP

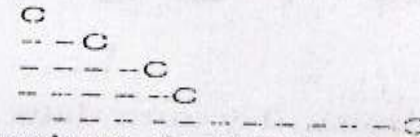


Fig. 2. Séquençage par la méthode enzymatique de terminaison de la chaîne par un didésoxy.

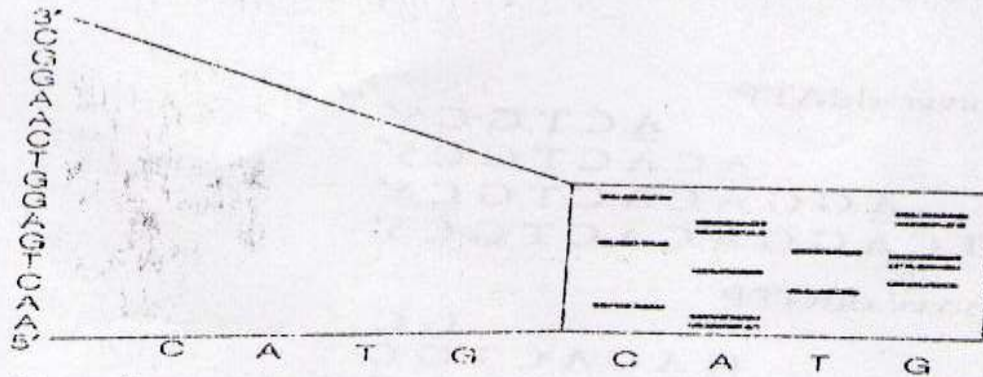


Fig. 3. Motif en échelle obtenu après séquençage d'ADN et électrophorèse.

# Séparation sur gel de polyacrylamide et autoradiographie

- Sur les 4 pistes d'un gel, le contenu de chacun des 4 tubes est déposé
- Les fragments nucléiques sont séparés par électrophorèse selon leur longueur
- Le pouvoir discriminant du gel de polyacrylamide est tel qu'il permet de différencier les brins ne différant que par un seul nt .
- A la fin de l'électrophorèse → autoradiographie ++ centaines de nt peuvent être lu sur le gel en une seule fois

5'-P      **ATGGCGTANNNNN**      3'-OH  
 ADN matrice monocaténaire

↓ hybridation  
 d'une amorce nucléotidique

5'-P      **ATGGCGTANNNNN**      3'-OH  
                   3'-OHNNNNN 5'-P

↓ + ADN polymérase  
 + [<sup>35</sup>S]dATP



4 dNTP  
 + ddGTP



**ATGGCGTANNNNN**  
**GCATNNNNN**

4 dNTP  
 + ddATP



**ATGGCGTANNNNN**  
**ATNNNNN**  
**ATGGCGTANNNNN**  
**ACGGCATNNNNN**

4 dNTP  
 + ddTTP



**ATGGCGTANNNNN**  
**TNNNNN**  
**ATGGCGTANNNNN**  
**TACGGCATNNNNN**

4 dNTP  
 + ddCTP



**ATGGCGTANNNNN**  
**CATNNNNN**  
**ATGGCGTANNNNN**  
**CCCATNNNNN**  
**ATGGCGTANNNNN**  
**CCGCATNNNNN**

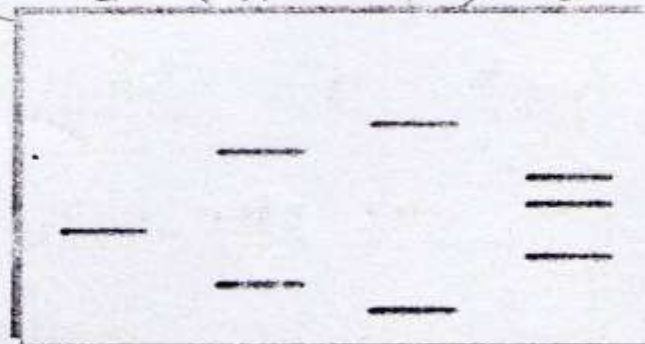
Toutes les chaînes  
 d'ADN néosynthétisées  
 se terminent par un "G"

Toutes les chaînes  
 d'ADN néosynthétisées  
 se terminent par un "A"

Toutes les chaînes  
 d'ADN néosynthétisées  
 se terminent par un "T"

Toutes les chaînes  
 d'ADN néosynthétisées  
 se terminent par un "C"

**G                  A                  T                  C**



**TAGCCAT**

(séquence 5'3'  
 du brin néosynthétisé)

électrophorèse en gel de polyacrylamide  
 et autoradiographie

5'-P                      **ATGGCGTANNNNNN**                      3'-OH  
ADN matrice monocaténaire

↓ hybridation  
d'une amorce nucléotidique fluorescente

5'-P                      **ATGGCGTANNNNNN**                      3'-OH  
   3'-OH NNNNNN \* 5'-P

↓ + *Taq* polymérase

4 dNTP  
+ ddGTP



4 dNTP  
+ ddATP



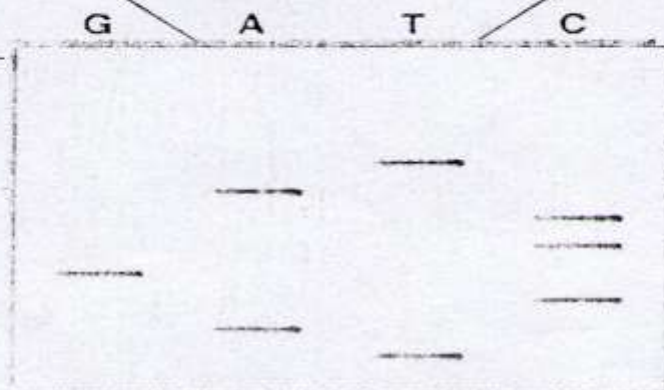
4 dNTP  
+ ddTTP



4 dNTP  
+ ddCTP



électrophorèse en gel de polyacrylamide  
(ou électrophorèse capillaire)



↓ détection laser



## *Bases de données*

- ✓ L'ADN, l'ARN et les séquences protéiques nouvellement déterminés s'insèrent ds la base de données (EMBL; Genbank)
- ✓ Collections disponibles pr l'analyse par ordinateur

### *Séquençage automatisée de l'ADN*

- Utilisation d'ordinateur compétent spécial pr rechercher les séquences protéiques et d'ADN

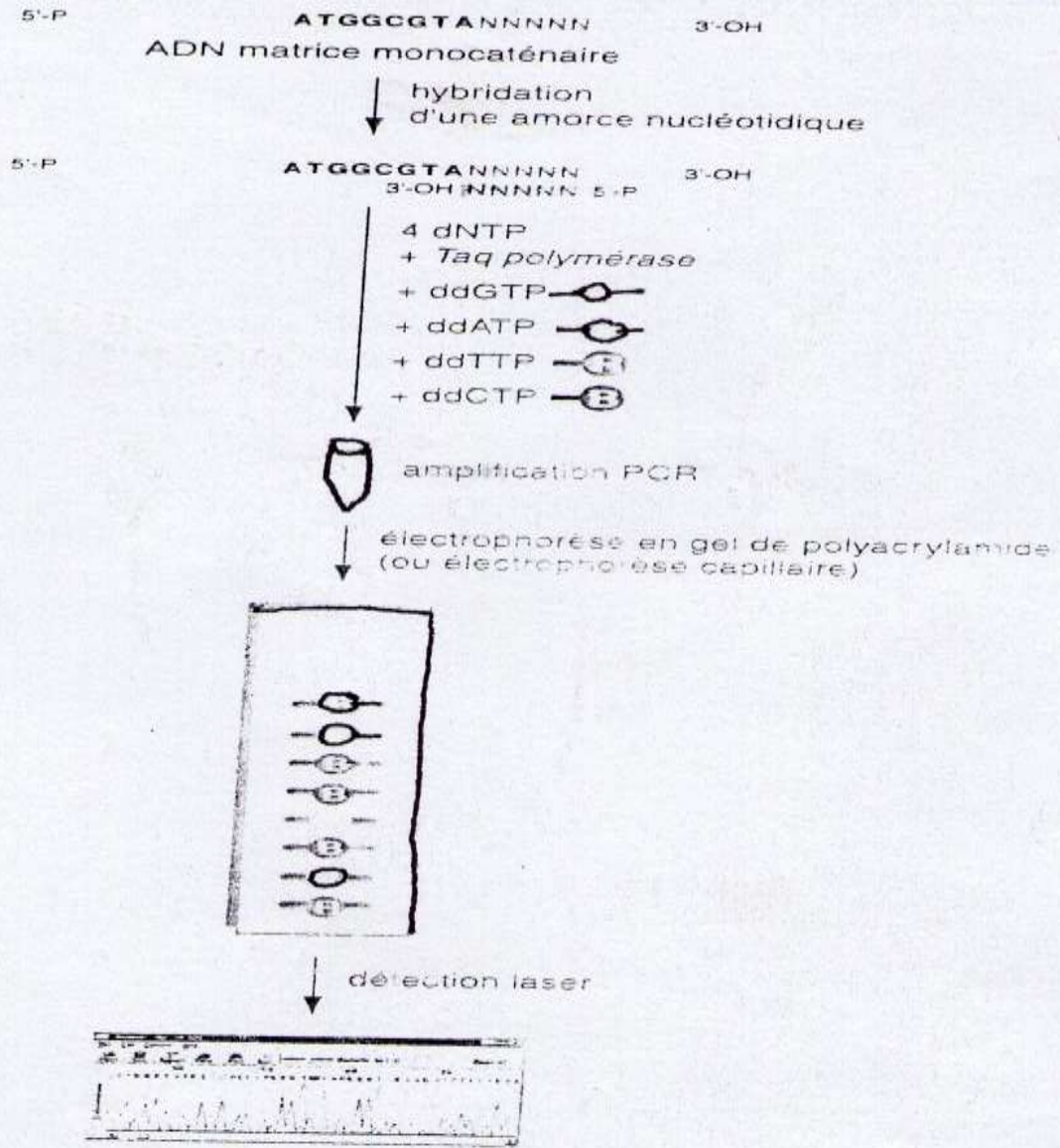


➤ Des instruments semi-automatiques contrôlés par un ordinateur ont été développés spécialement pour le séquençage de l'ADN

➤ Utilisation d'une seule m<sup>\*</sup> réactionnel qui contient les 4 ddNTPs marqués avec ≠ marqueurs colorés

➤ Migration sur gel de polyacrylamide → une série de molécules d'ADN (chacune fait un nt de moins que la suivante) marquées par des pigments ≠ en fct de la base terminale

➤ Identification de la base terminale en fct de la longueur d'onde de la fluorescence émise.



Désequençage automatique

## *Projets de séquençage*

Dvpt des séquenceurs automatiques et les stations de travail robotique → détermination des séquences génomiques des O\* importants:

- ✓ En raison de leur petite taille, ++ génomes de V\* ont été complètement séquencés (HIV.....)
- ✓ De B\* (*E. coli*)
- ✓ De levure (*S. cerevisiae*)
- ✓ Plante (*Arabidopsis thaliana*)
- ✓ .....
- ✓ Génome humain.



# **L'hybridation moléculaire**

# *Les hybridations moléculaires*

## **1- Le Southern blotting**

### *A- Principe*

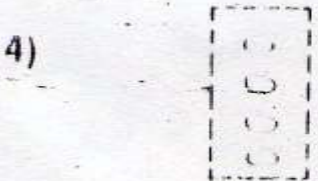
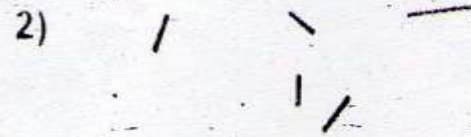
- ✓ Détecter l'ADN (analyse de la structure des gènes et la détection des anomalies)
- ✓ l'ADN à analyser est purifié s/s forme de gros fragments

## *B- Technique*

- ✓ Digestion par les ER → ++ fragments d'ADN de ≠ tailles
- ✓ Électrophorèse → séparation des fragments
- ✓ Dénaturation des fragments par NaOH → les rendre adapter à l'hybridation
- ✓ Transfert des fragments dénaturés sur mb NC  
→ ++ heures → réplique des fragments sur la mb (blotting)
- ✓ Fixation des fragments par UV ou à 80°C
- ✓ Hybridation avec des sondes marquées (T° et tampon adéquat)
- ✓ Rinçage → élimination des sondes non fixés
- ✓ Révélation du marquage → repérer la position des fragments hybridés avec la sonde

**Fig. 12.4**  
Technique de Southern.

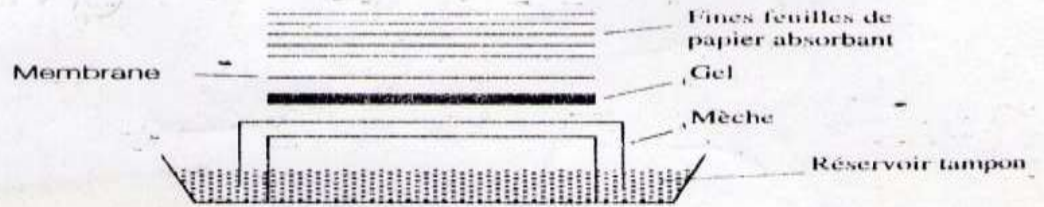
- 1) Extraction du DNA.
- 2) Attaque par enzymes de restriction.
- 3) Électrophorèse sur gel et dénaturation.
- 4) Transfert sur nylon et hybridation.
- 5) Autoradiogramme.



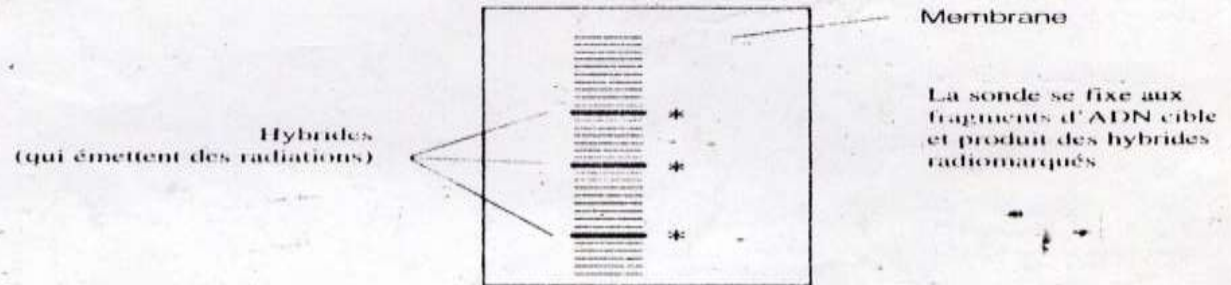
**Electrophorèse d'un gel d'agarose**



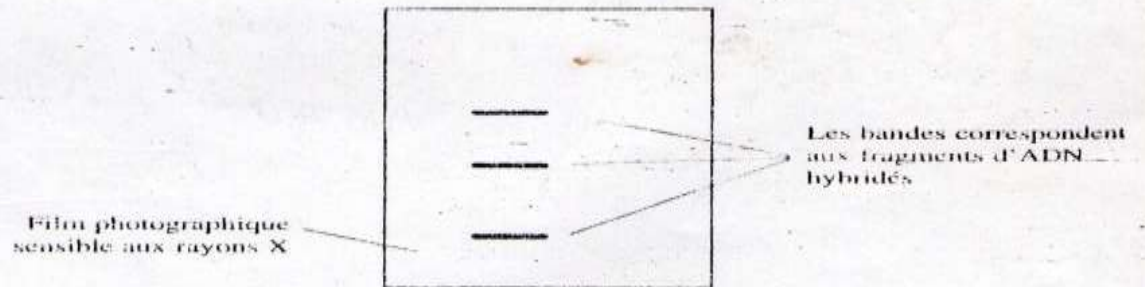
**Tamponnage par capillarité**



**Hybridation**



**Autoradiographie**

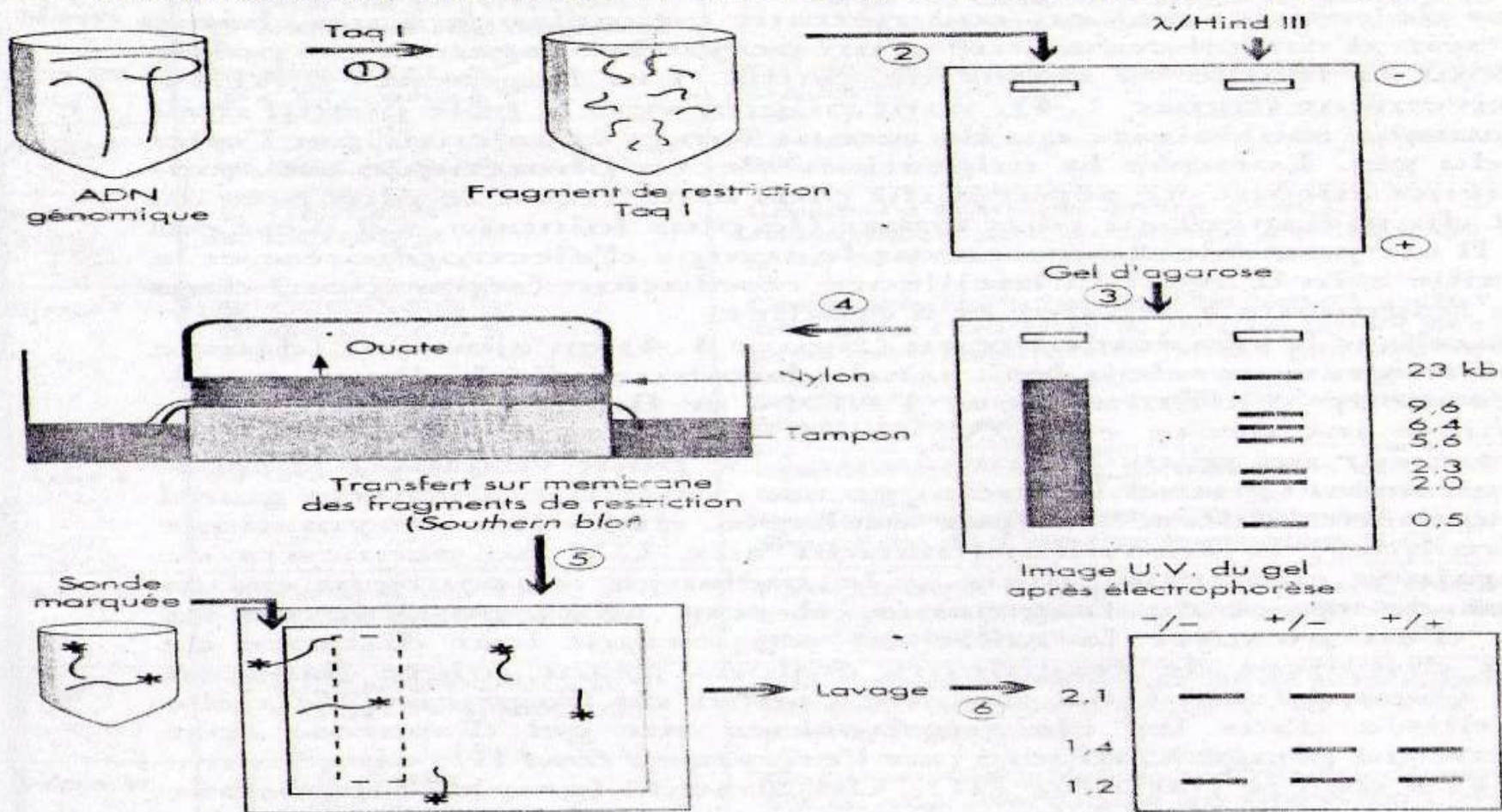


*Fig. 1 Le Southern blotting.*



Figure 1.5

Réalisation, finalité et analyse d'un *Southern blot*



1. L'ADN génomique d'un individu est digéré en fragments par une enzyme de restriction, par exemple TaqI.
2. Les fragments sont séparés par électrophorèse.
3. L'électrophorèse est visualisable (cf. figure 1.4).
4. Transfert des fragments sur membranes de nylon: *Southern blot*.
5. La membrane est hybridée avec une sonde marquée, spécifique des fragments à identifier.
6. Après lavage, la révélation du marquage permet de repérer la position des fragments hybridés par la sonde; le schéma présente les trois images possibles pour l'individu étudié avec une sonde spécifique d'un RFLP (voir section 1.9.8).

## 2- Le Northern blotting

### *A- Principe*

- ✓ Similaire au Southern blot
- ✓ analyse de l'ARN → déterminer les gènes actifs ds les ≠ types çaires.
- ✓ Les ARNms (qui dérivent des gènes actifs d'un type çaire) sont isolés
- ✓ Ils ont des tailles ≠ qui dépendent de la longueur des protéines.

## *B- Technique*

- ✓Électrophorèse → séparation des fragments
- ✓Transfert des fragments sur mb NC
- ✓Fixation
- ✓Hybridation avec des sondes marquées
- ✓Rinçage
- ✓Révélation du marquage → généralement une bande unique  $\equiv$  à l'ARNm reconnu par la sonde

NB:

- La position de la bande/ sommet de la mb  $\implies$  longueur de l'ARNm
- L'intensité de la coloration de la bande  $\implies$  quantité d'ARNm ds la  $\phi$   
càd l'expression du gène

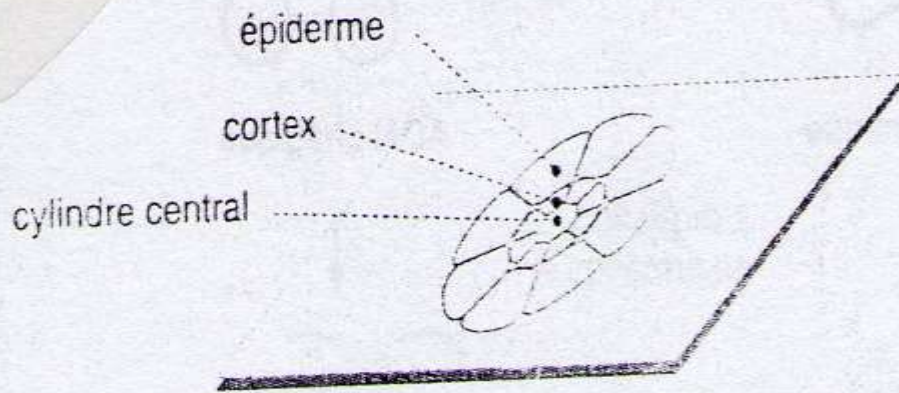
## 4- Hybridation In Situ

### *A- Principe*

Technique utilisée pour l'identification des ARNm spécifiques présents ds des  $\phi$  appartenant à des tissus contenant un gd nbre de types  $\phi$ aires. Ex: l'insuline produits par les  $\phi$   $\beta$  du pancréas.

### *B- Technique*

- ✓ De fines tranches de tissus sont coupés à l'aide d'un microtome
- ✓ Elles sont placées sur une lame de microscope
- ✓ la sonde est ajoutée aux  $\phi$  de la lame  $\rightarrow$  pénétrer ds le cyt  $\rightarrow$  se fixer à l'ARNm cible  $\rightarrow$  formation d'hybrides
- ✓ Révélation du marquage  $\rightarrow$  apparition de zones colorées à l'intérieur des  $\phi$  s/s microscope



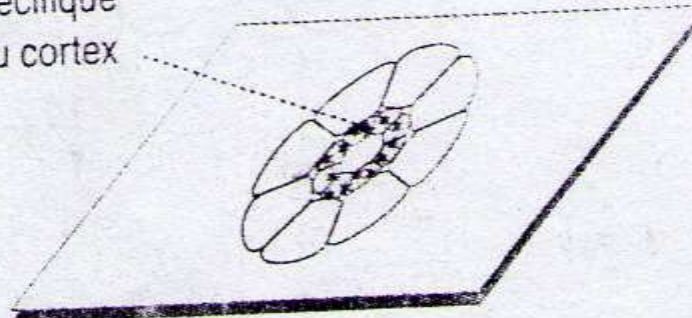
coupe transversale d'une racine

← solution de ribosonde

↙ ↘ hybridation

↓ lavages et révélation

hybridation spécifique  
dans les cellules du cortex



Hybridation In Situ



# **La PCR**

# LA PCR: Polymerase Chain Reaction ou la réaction de polymerisation en chaine

## *A- Principe*

- ✓ Technique décrite en 1985 par K. MULLIS et al
- ✓ Permet d'amplifier de manière considérable la quantité d'ADN in vitro par voie enzymatique

## *Les constituants*

- ✓ ADN matrice: séquence d'ADN à amplifier
- ✓ Des amorces : de 15 à 30 nts
- ✓ Une ADNpol: Taq pol
- ✓ Les dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

## ***B- Technique***

Cette technique impose de connaitre la séquence des régions qui délimitent le segment d'ADN à amplifier ==> synthèse des oligo-nts complémentaires qui auront 2 fcts:

- ✓ Permettent de repérer la partie d'ADN à amplifier
- ✓ Serviront d'amorce à l'ADN pol

Des cycles successifs sont entrepris et chaque cycle comprenant:

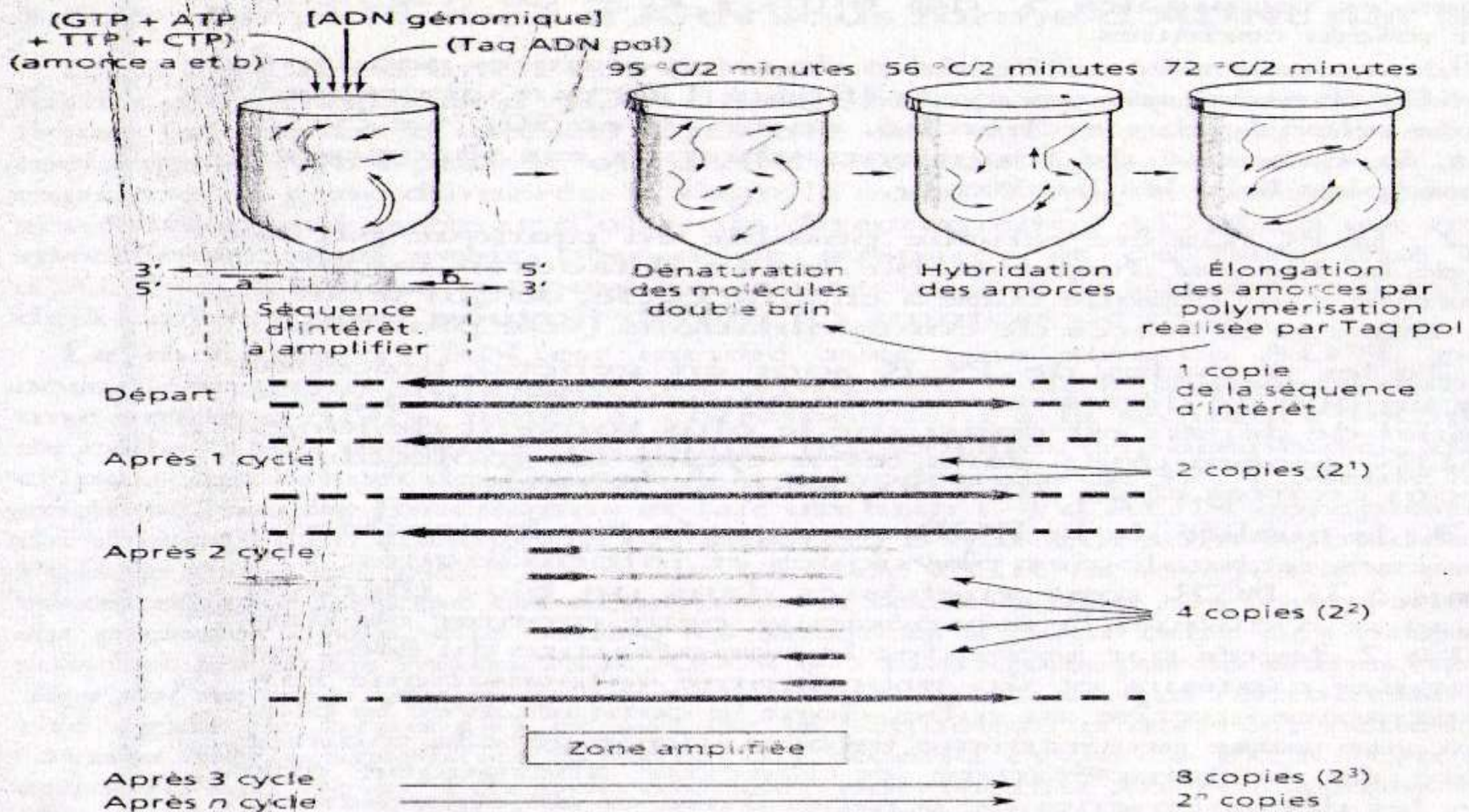
- ✓ La dénaturation ( $92^{\circ}$  à  $95^{\circ}\text{C}$ ): séparation des 2 brins de la d.h qui peuvent être copier par l'ADN pol
- ✓ L'hybridation des amorces= amorçage ( $50$  à  $55^{\circ}\text{C}$ ) : l'une des amorces se fixe sur un brin d'ADN et la 2ème sur l'autre
- ✓ L'élongation ( $70^{\circ}$  à  $72^{\circ}\text{C}$ ): extension des amorces avec ADN pol



# La Taq pol

- ✓ ADN pol non inactivée par la chaleur
- ✓ Isolée d'une B\* thermophile adaptée à la vie ds des sources d'eau chaude « *thermus aquaticus* »
- ✓ Il est possible maintenant d'automatiser ces réaction grâce à des cycleurs thermiques (programmable en t° et en tps)

## Principe de la PCR



Un cycle de PCR comporte trois étapes :

- étape 1 : dénaturation des duplex d'ADN par chauffage à 95 °C pendant 30 à 90 secondes;
- étape 2 : hybridation des amorces (amorçage) a/+ et b/- sur les brins - et +, pendant 30 à 60 secondes, à une température permettant leur hybridation spécifique aux extrémités 5' de la séquence à amplifier;
- étape 3 : élongation des amorces : le tube est soumis pendant 30 à 120 secondes à la température de 72 °C correspondant à l'optimum d'activité de la *Taq pol*; celle-ci allonge les amorces et synthétise un néo-brin face aux matrices - et +, ce qui double la quantité de fragments d'intérêt.