



Université Mohamed Khider-Biskra  
Faculté des sciences exactes et des sciences de la  
nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie



# Les techniques de base de la biologie moléculaire

Mr. BENSLAMA A.

2016/2017

---

Préparation des acides  
nucléiques (extraction  
et purification)

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques de génies génétique. L'objectif des méthodes d'extraction des acides nucléiques dans le cas présent est d'obtenir des acides nucléiques purifiés, tirés de sources diverses, afin de pouvoir mener une analyse spécifique comme la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR. Afin d'obtenir des acides nucléiques hautement purifiés exempts de tout contaminant visibles, des méthodes d'extraction adéquates devraient être appliquées.

## Préparation des acides nucléiques (extraction et purification)

Les méthodes d'extraction/purification des acides nucléiques issus d'extraits cellulaires sont généralement des combinaisons de deux ou plusieurs des techniques et avec plusieurs étapes.

✓ Lyse des cellules

✓ Elimination des protéines

✓ Elimination des autres acides nucléiques (ARN, etc.)

✓ Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

➤ Extraction/précipitation

➤ Chromatographie

➤ Centrifugation

➤ Séparation par affinité

## Méthode de extraction/purification

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité de 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. Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :

✓ le rupture mécanique (ex. : broyage ou lyse hypotonique)

✓ le traitement chimique (ex.: lyse détergente, agents chaotropiques, réduction des thiols)

✓ 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.

## Méthode de extraction/purification

L'extraction utilise la solubilité différentielle des molécules (acides nucléiques / contaminant) entre deux phases non miscibles. En pratique, on mélange vigoureusement la solution d'acides nucléiques à une phase non miscible. Après centrifugation, récupérer la phase aqueuse contenant les acides nucléiques à la pipette. Selon la phase non miscible, on distingue :

- ❖ l'extraction phénolique: utilisée pour débarrasser les acides nucléiques des protéines ; le phénol étant un déprotéinisant puissant.  
Ex : purification d' ADN ou ARN à partir de cellules
- ❖ l'extraction au chloroforme ou éther: complète toujours l'extraction précédente pour éliminer toutes traces de phénol.
- ❖ l'extraction à l'isobutanol: permet d'extraire les molécules organiques (ex : bromure d'éthidium) et de concentrer la solution d'acides nucléiques de 10%.

### Extraction de l'ADN

Le lysat obtenu des préparations précédentes est purifié par addition de phénol saturé de tampon Tris-EDTA. Après agitation douce du mélange, on sépare les phases par une centrifugation de 10 min sous 10000 g à la température de 4°C. A la sortie, on distingue une phase aqueuse surnageante contenant les acides nucléiques en solution, une phase organique au fond du tube: phénol + lipides et à l'interface un « gâteau » de protéines précipitées. On recueille la phase aqueuse avant de la laver par un mélange de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et d'alcool isoamylique dans un rapport 24/1 (volume/volume). On recueille à nouveau une phase aqueuse contenant l'ADN en solution et une phase organique (24/1) contenant des restes de phénol, de protéines et de lipides.

## Précipitation des acides nucléiques

Elle se fait le plus souvent par addition répétée des solutions d'alcool qui suffisent à débarrasser l'acide nucléique des protéines contaminantes et enzymes. Elle a pour but de récupérer les acides nucléiques sous forme solide. Ainsi protégés, ils pourront après séchage être résolubilisés à la concentration souhaitée.

### Principe

En présence d'alcool, les brins d'ADN se regroupent et forme une pelote non soluble favorisant ainsi l'interaction ADN-Alcool au dépend de l'interaction ADN-ADN. Diverses solutions alcooliques peuvent être utilisées pour la précipitation. On a par exemples :

- ✓ Précipitation à l'alcool éthylique à haute force ionique. L'éthanol à forte concentration précipite presque totalement les acides nucléiques. Récupérer le précipité par centrifugation
- ✓ Précipitation à l'isopropanol : même principe que précédemment sauf que le sel n'est pas nécessaire et que les petits fragments d'ADN sont éliminés car non précipités.

Précipitation des acides nucléiques



Précipitation de l'ADN

La solution d'ADN, portée à haute force ionique par addition de NaCl 3 M (1/10 du volume), est additionnée d'un large excès d'éthanol absolu à -20°C. Au bout de quelques minutes au maximum, on voit apparaître un précipité blanchâtre, translucide et filamenteux (la « méduse ») constitué de longs filaments d'ADN précipité. On recueille ce précipité par centrifugation à 10000 g pendant un quart d'heure environ. Pour laver l'ADN on resuspend le précipité dans de l'éthanol à 75 % toujours à -20°C. puis on centrifuge à nouveau. Le culot de cette dernière centrifugation est égoutté, puis séché sous vide. On peut conserver l'ADN à sec ou le redissoudre immédiatement soit dans de l'eau pure stérile, soit dans un tampon Tris-EDTA.

Précipitation des acides nucléiques



Précipitation de l'ARN

Parmi les acides ribonucléiques extraits des cellules, la classe la plus étudiée est celle des ARN messagers. La phase aqueuse transférée dans un nouveau tube, on fait précipiter l'ARN ( phase aqueuse) avec l'isoéthanol. Utiliser 0.5ml d'isopropanol pour 1ml frizol incubé à 15-30°C. Centrifuger à 12000g maximum 15min entre 2°C et 8°C le précipité. L'ARN, souvent invisible avant centrifugation, forme un culot colloïdal du côté et au fond du tube. Le précipité d'ARN étant invisible avant centrifugation, on procède à un lavage.

Différentes variantes sont employées, suivant que l'on cherche à extraire de l'ADN génomique (issu du ou des chromosomes des cellules analysées) ou de l'ADN plasmidique (provenant de plasmides portés le plus souvent par des cellules bactériennes comme *Escherichia coli*). Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement ces extractions à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

### Préparation d'ADN génomique

On commence en général par une lyse des cellules ou des tissus, consistant éventuellement en un broyage, suivi d'une extraction par des détergents, qui vont disperser les bicouches lipidiques des membranes et dénaturer les protéines, et en particulier celles qui sont associées à l'ADN dans la chromatine. La solution obtenue est en général très visqueuse, car l'ADN ainsi libéré forme de très longs filaments qui s'opposent aux écoulements hydrodynamiques.

### Préparation d'ADN génomique

L'étape suivante est la déprotéinisation de la solution qui se fait par une extraction au moyen de solvants organiques, en général du phénol additionné de plus ou moins de chloroforme. Les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée par décantation ou par centrifugation.

L'ADN est ensuite précipité par addition d'éthanol ou d'isopropanol dans la phase aqueuse, collecté par centrifugation et dissout dans du tampon. Pour éliminer les traces de phénol et d'autres contaminants, on peut enfin pratiquer une dialyse ou une étape de purification par chromatographie préparative.

## Préparation d'ADN plasmidique

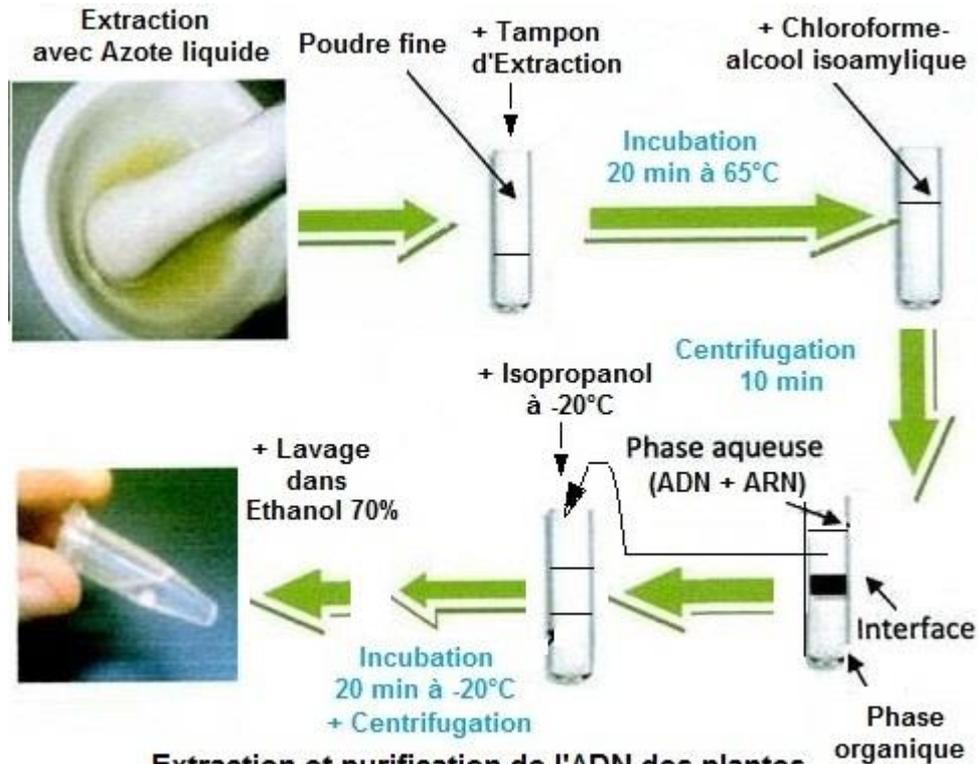
La préparation d'ADN plasmidique à partir de bactéries est l'une des techniques les plus courantes de la biologie moléculaire, également connue sous les noms abrégés de **miniprep**, **midiprep** et **maxiprep** en fonction du volume de la culture bactérienne utilisée. Le principe de l'extraction est connu sous le nom de lyse alcaline. Cette méthode permet de préparer sélectivement l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien. Le principe de cette méthode consiste à effectuer la lyse des cellules au moyen d'un détergent (dodécyl sulfate de sodium) en présence de soude, à pH 13. À ce pH très alcalin, l'ADN est dénaturé, c'est-à-dire que les deux brins de la double-hélice sont séparés. On neutralise ensuite rapidement la solution, ce qui provoque la renaturation brutale (réappariement des brins du duplex d'ADN).

## Préparation d'ADN plasmidique

L'ADN chromosomique, très long ( $\sim 10^6$  paires de base), ne parvient pas à se réapparier complètement et forme des enchevêtrements insolubles. L'ADN plasmidique, court ( $\sim 10^3$  paires de base), parvient à se réassocier complètement et reste en solution. On sépare alors les espèces par centrifugation. Les protéines précipitées, sont également éliminées avec le détergent et l'ADN chromosomique. L'ADN plasmique, resté en solution, est alors concentré par précipitation à l'alcool.

Différentes variantes ou améliorations de cette méthode existent notamment dans un grand nombre de kits commerciaux. Ces derniers contiennent souvent des petites colonnes de résine chromatographique échangeuse d'ion, permettant d'améliorer la pureté de l'ADN obtenu. Pour éliminer les ARN, on ajoute fréquemment des ribonucléases qui vont hydrolyser sélectivement ces acides nucléiques, en laissant l'ADN intact.

# Préparation des acides nucléiques (extraction et purification)



**Extraction et purification de l'ADN des plantes**  
(CR Etudiant, S4 (TP), Faculté des Sciences, Marrakech, Maroc)

## Vérification de la pureté

Au terme de notre purification, on peut vérifier son effectivité soumettant notre acide nucléique à divers tests pour vérifier sa pureté.

- Electrophorèse sur gel d'agarose.

- PCR : La réaction en chaîne par polymérase

## Préparation des acides nucléiques (extraction et purification)

Vérification de la pureté



Electrophorèse sur gel d'agarose

Par électrophorèse sur gel d'agarose, on peut analyser la présence et la taille des acides nucléiques contenus dans la préparation. Ceux-ci sont révélés par le bromure d'éthidium, un colorant dont la fluorescence augmente très sensiblement quand il interagit avec l'ADN.

En milieu basique, les fragments d'ADN sont chargés négativement. Placé dans un champ électrique, ils vont donc déplacer vers l'anode, mais leurs charges respectives étant à peu près équivalentes, c'est leur masse moléculaire qui va régler leur vitesse de déplacement à travers les mailles du gel dans lequel ils ont été placés. Plus les fragments sont petits, plus ils vont migrer rapidement et donc, plus loin de la zone de dépôt.

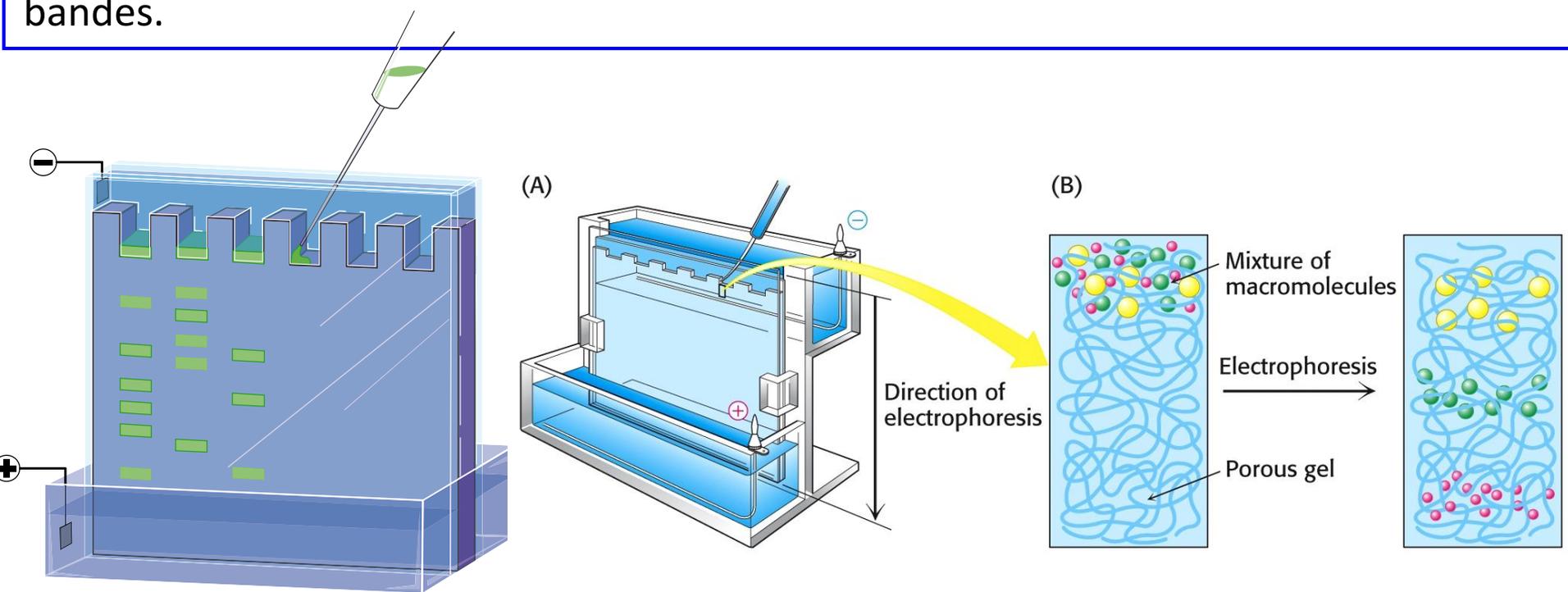
# Préparation des acides nucléiques (extraction et purification)

Vérification de la pureté



Electrophorèse sur gel d'agarose

La dilution et la densification de l'ADN par une solution colorée de bleu de bromophénol (BBP) va permettre de suivre l'avancement de. Chaque fragment de restriction est déposé dans le gel et la cuve mise sous tension (250 V) pendant une heure environ. Quand le front de migration atteint l'extrémité du gel, on arrête la manipulation. Le gel est introduit dans une cage connectée à un écran d'ordinateur. La projection de la lumière UV permet d'observer les migrations de différentes bandes.



---

**PCR**

L'amplification en chaîne par polymérase ou réaction en chaîne par polymérase (PCR est l'abréviation anglaise de polymerase chain reaction),

La PCR est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique (séquence spécifique d'ADN (l'Amplicon)) et d'amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides.

La PCR permettant d'obtenir, à partir d'un échantillon d'ADN, d'importantes quantités d'une séquence d'ADN spécifique. Cette amplification repose sur la réplication d'une matrice d'ADN double brin. Elle se décompose en trois phases : une phase de dénaturation, une phase d'hybridation avec des amorces et une phase d'élongation. Les produits de chaque étape de synthèse servent de matrice pour les étapes suivantes, ainsi on réalise une amplification exponentielle.

## Les éléments de PCR

### L'ADN matriciel

En théorie une copie ADN de la séquence recherchée est suffisante pour avoir une amplification, il faut cependant tenir compte de la probabilité de « rencontre » des molécules d'ADN matrice avec **les amorces**. Dans la pratique plusieurs copies sont nécessaires pour avoir un résultat correct. Mais attention, la mauvaise qualité et/ou une quantité trop importante d'ADN matrice peut conduire à une amplification **aspécifique**, voire à une inhibition enzymatique.

### L'ADN polymérase

Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées), comme par exemple *Thermus aquaticus* (**Taq polymérase**). De nos jours, les enzymes utilisées sont dites **recombinantes**, ce qui simplifie considérablement leur obtention, et leurs propriétés ont été largement modifiées pour les rendre plus efficaces et plus fidèles.

## Le tampon

Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase (TrisHCl à pH basique 8,5 à 9). Il contient des cations bivalents  $Mg^{2+}$ , cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents  $Mg^{2+}$  et de cations monovalents ( $K^+$  ou  $NH_4^+$ ) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN. En pratique, la concentration en sel doit cependant rester compatible avec l'activité de l'ADN polymérase. En plus de ça le milieu contenant les dNTPs.

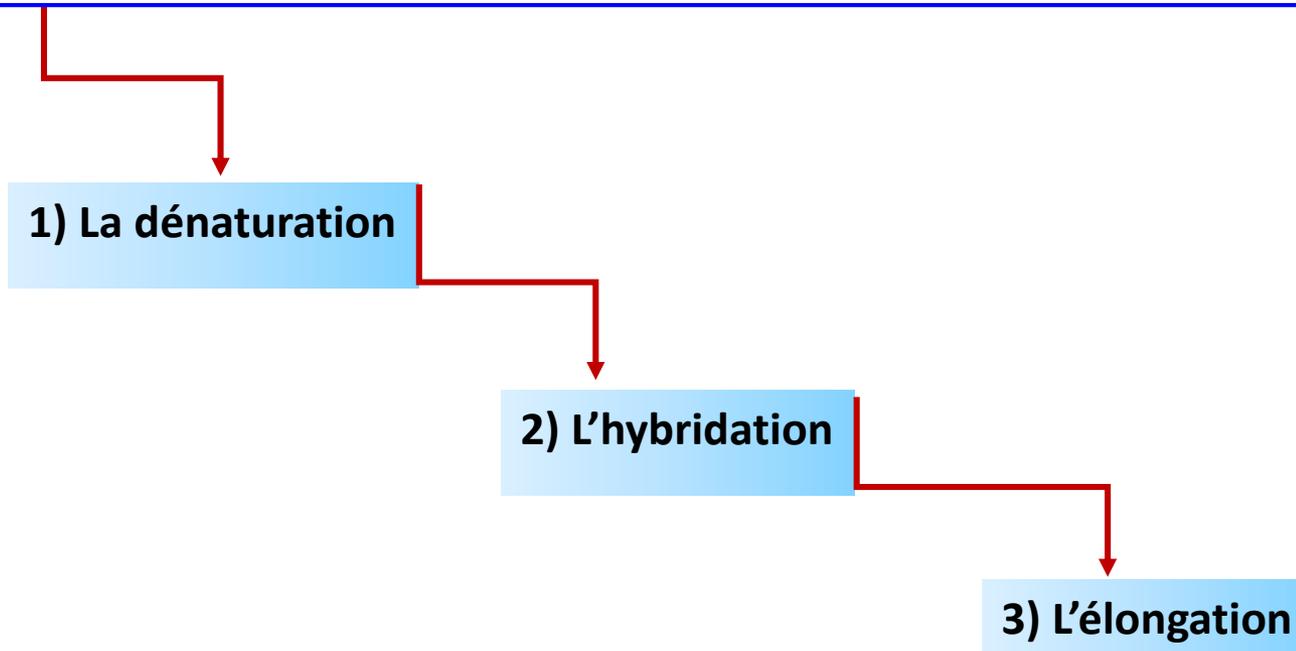
## Les amorces

Dans la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces est crucial. Elles vont avoir un rôle : en s'hybridant à l'ADN matrice, elles délimitent la région d'ADN à amplifier (étape 2 du cycle) et avec leur extrémité 3' OH libre servir d'amorce pour l'ADN polymérase (étape 3 du cycle).

Les oligonucléotides amorces s'hybrident aux extrémités de la séquence qui va être amplifiée, il faut donc connaître les séquences nucléotidiques des extrémités de la région ADN amplifiée. C'est en effet au niveau de ces extrémités que les oligonucléotides amorces vont s'hybrider.

## Les étapes de la PCR

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. Sauf pour certaines méthodologies (par exemple l'utilisation de sondes d'hydrolyse), chaque cycle contient trois étapes.





C'est la séparation des deux brins d'ADN, obtenue par élévation de la température. Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95 °C) est réalisée. Cette étape permet de : déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases de type « Hot start », de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (Transcriptase Inverse, Uracil-N-Glycosylase). L'étape de dénaturation, est réalisée à environ 95°C, pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.

## Les étapes de la PCR



## 2) L'hybridation

Cette étape (généralement 2 à 60 secondes à 56-64 °C) permet aux amorces de s'hybrider aux ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider (se lier) avec leur brin complémentaire, ce qui empêcherait la fixation des amorces, car ces dernières sont bien plus courtes et en concentration bien plus importante. L'étape d'hybridation se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.

En abaissant la température, les amorces spécifiques s'hybrident sur les molécules simple brin d'ADN. Les amorces sont constituées de courtes séquences d'ADN complémentaires de la séquence de l'ADN à amplifier. Il s'agit toujours d'un couple d'amorces, complémentaire encadrant le fragment d'ADN à amplifier.

## Les étapes de la PCR

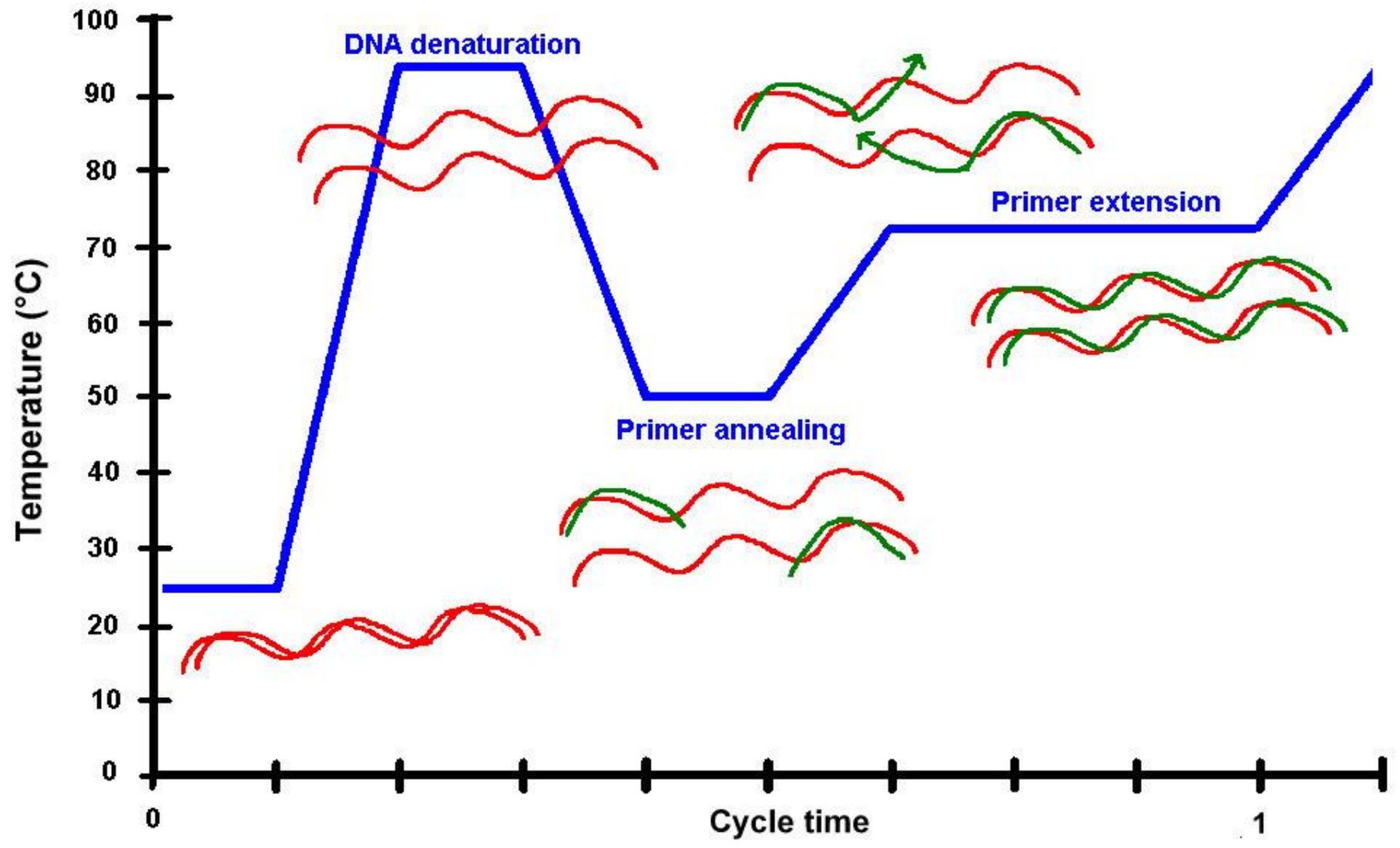


## 3) L'élongation

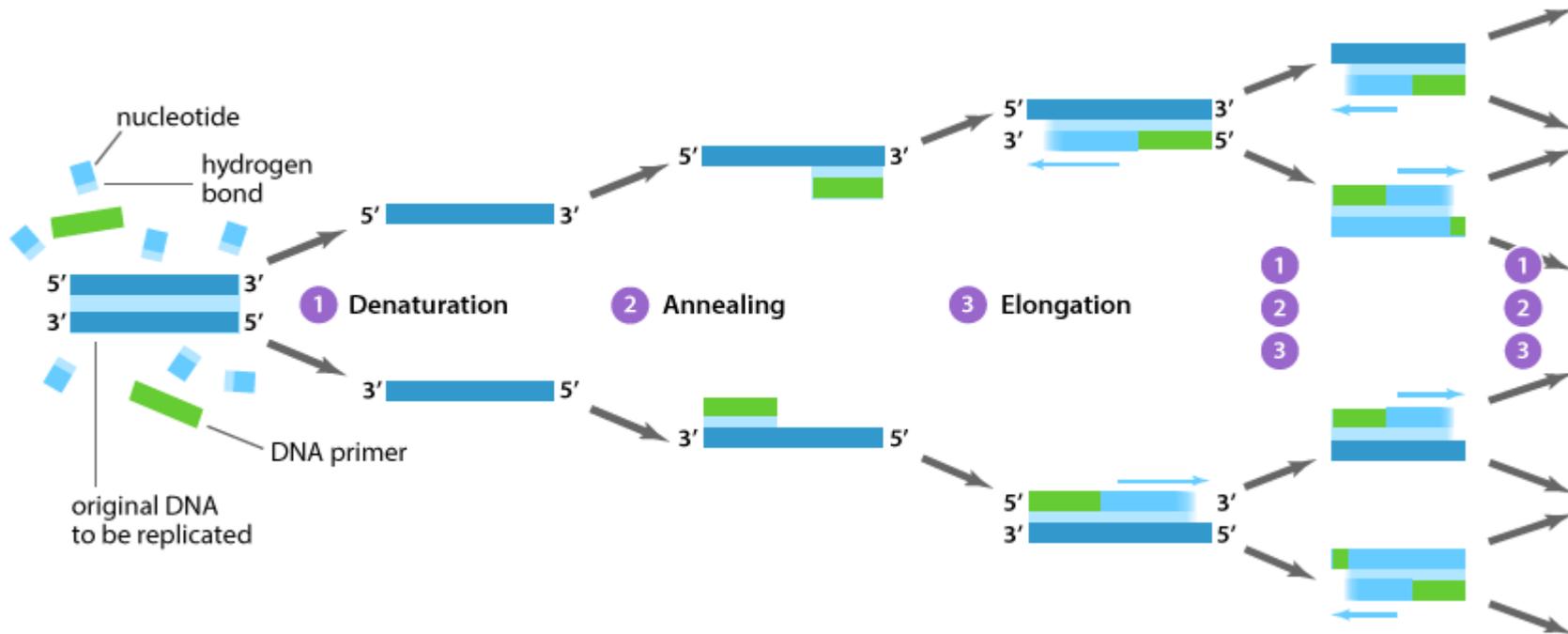
Cette étape (généralement 4 à 120 secondes à 72 °C) permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon. l'étape de polymérisation est à environ 72°C, température de « travail » de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

C'est la synthèse du brin complémentaire. Une enzyme polymérase, la Taq polymérase, ajoute à l'extrémité de l'amorce des oligonucléotides présents dans le milieu de réaction. Un cycleur, sorte de bain-marie, où les montées et descentes en température sont programmées, permet de réaliser un nombre de cycles déterminé.

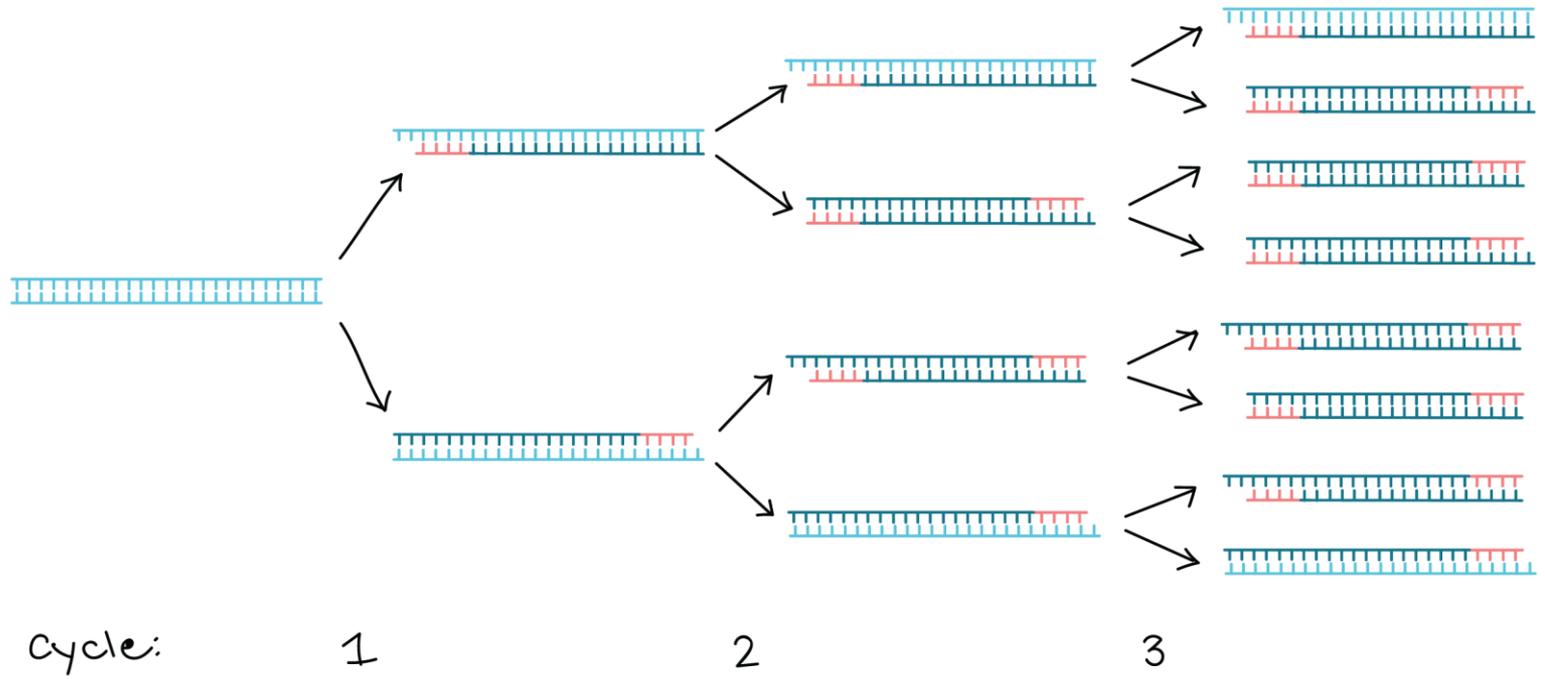
Les étapes de la PCR



## Les étapes de la PCR



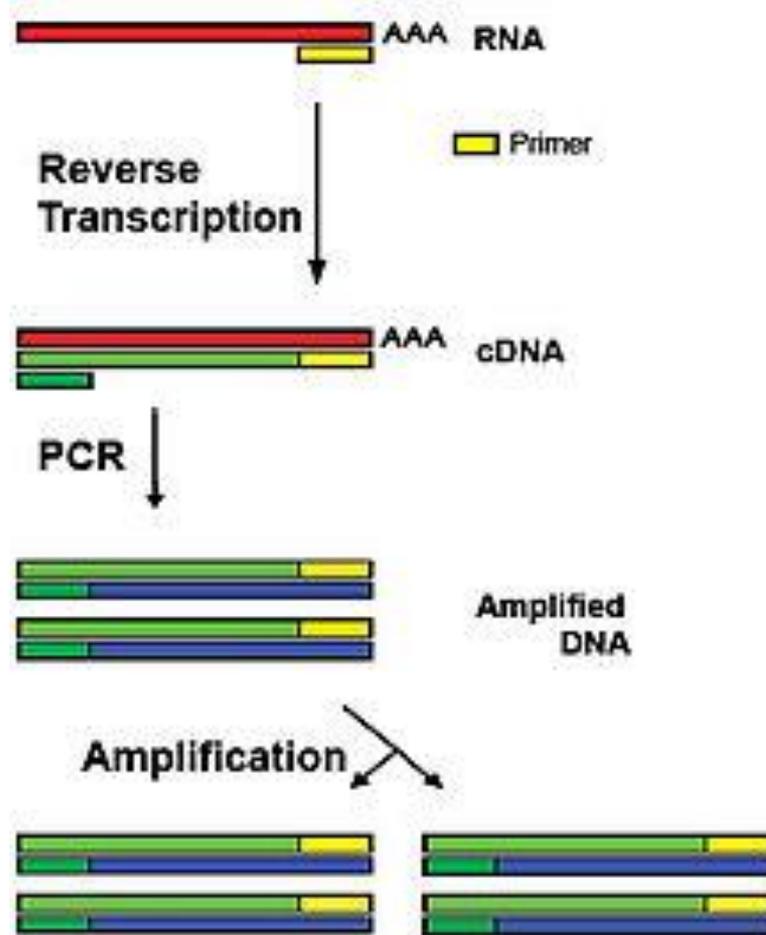
## Les étapes de la PCR



L'acronyme RT-PCR signifie Reverse Transcriptase PCR, soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc)

La RT-PCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit grâce à une enzyme appelée **transcriptase inverse**, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR.

Dans la recherche scientifique, la technique de **qRT-PCR**, pour RT-PCR quantitative, est fréquemment utilisée. Celle-ci permet de quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon. Elle est par exemple utilisée pour connaître le niveau d'expression d'un gène dans une condition donnée. Plus un gène est exprimé, plus le nombre de molécules d'ARN synthétisées sera grand. Grâce à la qRT-PCR, les chercheurs peuvent donc comparer le niveau d'expression d'un gène donné dans deux conditions différentes.



## Synthèse de l'ADNc

La synthèse d'ADNc est catalysée par des **transcriptases inverses** (reverse transcriptase RT en anglais). Ces enzymes sont des ADN polymérase ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire (cf. tableau ci-dessous). Cela correspond effectivement à l'«inverse» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN.

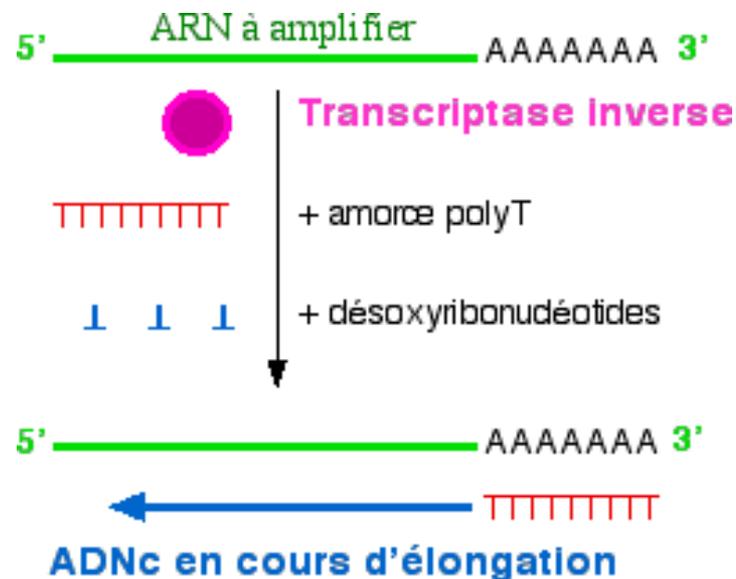
Les transcriptases inverses sont des enzymes issues de rétrovirus dont elles sont une des principales caractéristiques.

Exemples : la transcriptase inverse du Virus du Myéloblastome Aviaire (AMV) ou du Virus de la Leucémie Murine (Mo-MLV ou Mu-LV).

ARN matrice	ADNc synthétisé
A	T
G	C
C	G
U	A

## Synthèse de l'ADNc

Comme toutes les ADN polymérases, les transcriptases inverses ne peuvent pas initier seules la synthèse d'un brin d'ADN. Elles ont besoin d'une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre. Lorsque les ARN à amplifier sont polyadénylés en 3' (ARNm eucaryotes par exemple), l'amorce choisie peut être simplement une séquence polyT constituée d'une succession de désoxythymidines (comme sur le schéma ci-dessous en rouge). Dans ce cas, tous les ARNm sont a priori copiés en ADNc.



---

# Le séquençage de l'ADN

# Le séquençage de l'ADN

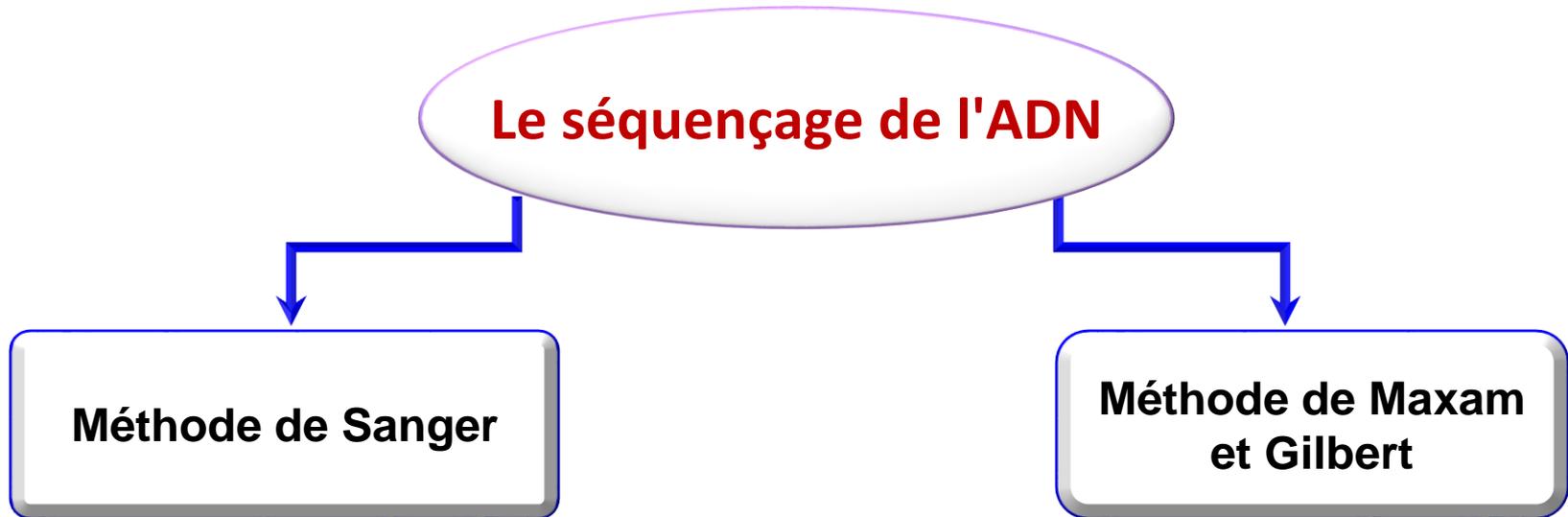
Le séquençage de l'ADN, consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Le séquençage d'un ADN, c'est à dire la détermination de la succession des nucléotides le composant

## Historique

Les premières techniques de séquençage ont été développées en parallèle au milieu des années 1970. Les méthodes de Sanger (Grande-Bretagne) et Gilbert (Etats-Unis) ont toutes deux été récompensées d'un prix Nobel de chimie en 1980.

Le premier organisme a été séquencé en 1977. Il s'agissait du virus bactériophage,, X174, possédant un ADN simple brin ne nécessitant donc pas l'étape de dénaturation utilisé dans les méthodes de Sanger et Maxam et Gilbert.

L'apparition des séquenceurs automatiques a notamment permis l'automatisation de ces technologies et ont contribué à la finalisation du génotypage humain en 2003.



## Méthode de Sanger

Le principe de cette méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par le fragment de **Klenow** (une **ADN polymérase I dépourvue d'activité exonucléase 5'→3'**) et maintenue par des ADN polymérases thermostables, celles qui sont utilisées pour la PCR. Les quatre **désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)** sont ajoutés, ainsi qu'une faible concentration de l'un des quatre didésoxyribonucléotides (**ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP**).

*Nature Vol. 265 February 24 1977*

687

---

## articles

---

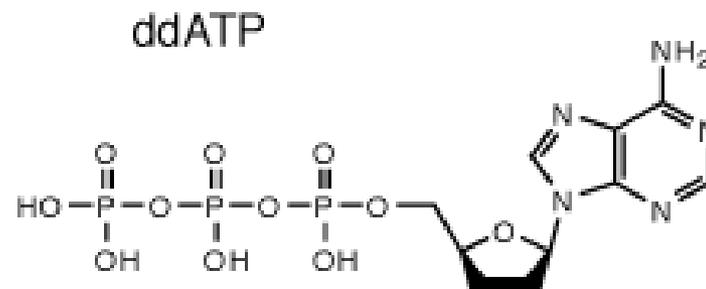
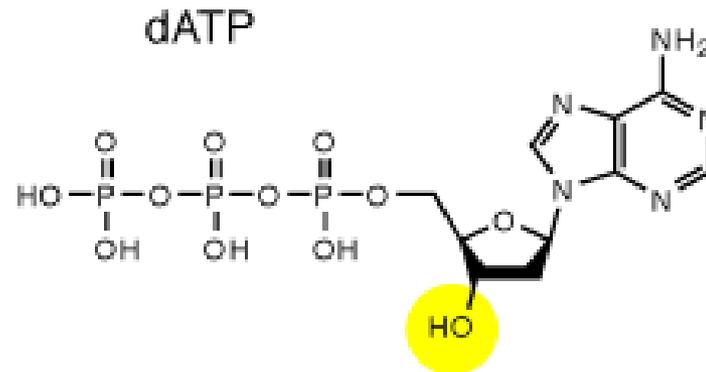
### **Nucleotide sequence of bacteriophage Φ X174 DNA**

**F. Sanger, G. M. Air<sup>\*</sup>, B. G. Barrell, N. L. Brown<sup>†</sup>, A. R. Coulson, J. C. Fiddes,  
C. A. Hutchison III<sup>‡</sup>, P. M. Slocombe<sup>§</sup> & M. Smith<sup>\*</sup>**

MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK

## Méthode de Sanger

Ces **didésoxyribonucléotides** agissent comme des « poisons » terminateurs de chaîne: une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Cette terminaison se fait spécifiquement au niveau des nucléotides correspondant au didésoxyribonucléotide incorporé dans la réaction. Pour le séquençage complet d'un même fragment d'ADN, on répète cette réaction quatre fois en parallèle, avec les quatre didésoxyribonucléotides différents.



## Méthode de Sanger

Par exemple, dans la réaction où on a ajouté du ddGTP, la synthèse s'arrête au niveau des G. Le mélange réactionnel contenant, à la fois du dGTP et un peu de ddGTP, la terminaison se fait de manière statistique suivant que l'ADN polymérase utilise l'un ou l'autre de ces nucléotides. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent tous au niveau d'un des G dans la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide6, ce qui permet ainsi de repérer la position des G dans la séquence.

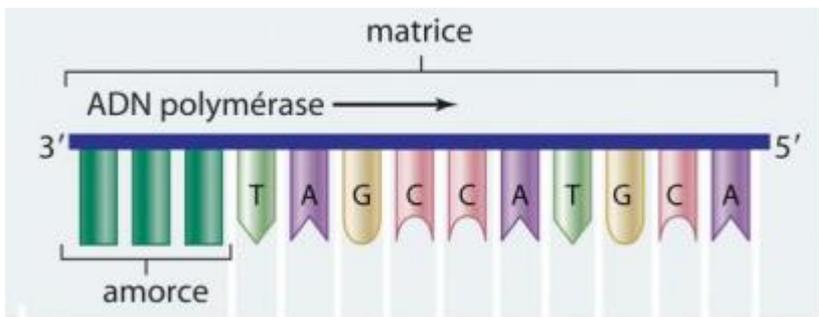
La détection des fragments ainsi synthétisés se fait en incorporant un traceur dans l'ADN synthétisé. Initialement ce traceur était radioactif ; aujourd'hui, on utilise des traceurs fluorescents, attachés soit à l'oligonucléotide, soit au **didésoxyribonucléotide**.

## Méthode de Sanger

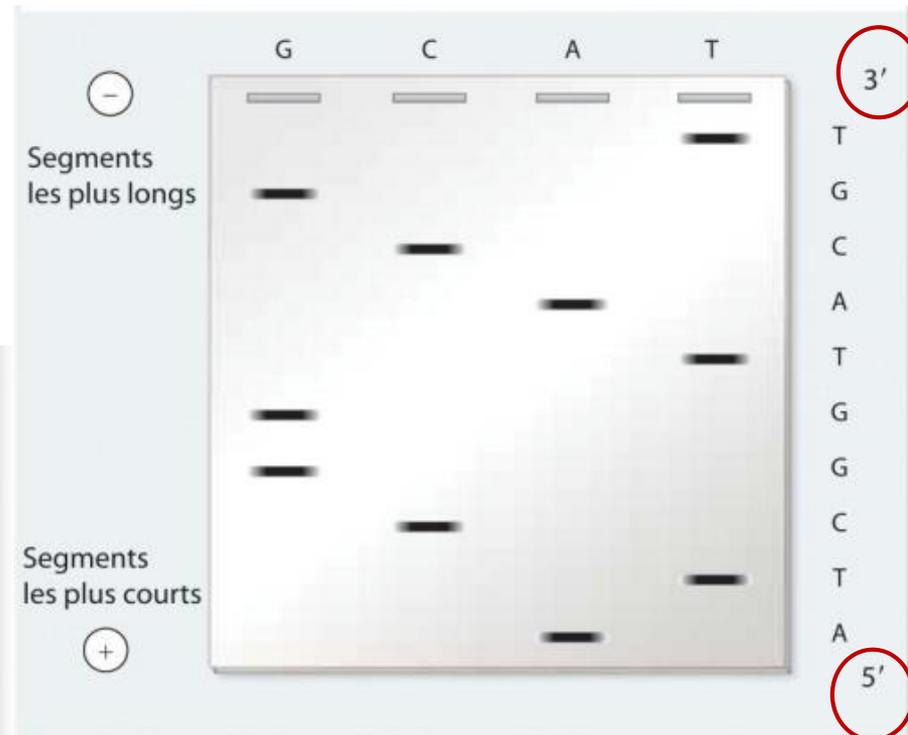
Pour commencer, il vous faut **un brin d'ADN** à séquencer. Ensuite, vous ajoutez une séquence d'amorce, les quatre nucléotides et un enzyme appelé ADN polymérase qui incorpore de nouvelles bases de nucléotide, faisant un nouveau brin d'ADN conforme à l'original. Dans la méthode originale de Sanger, quatre différentes réactions de séquençage sont effectuées. Chaque réaction comprend un nucléotide modifié différent qui, une fois incorporé, constitue la fin d'une chaîne d'ADN, ce qui permet d'identifier la base finale. Ces échantillons sont alors soumis à l'électrophorèse en gel, méthode qui permet de séparer les nouveaux brins d'ADN sur une base en gel à l'aide de courant électrique. Les brins d'ADN peuvent alors être vus à l'aide de rayons X ou de lumière ultraviolette. Pour lire le gel, vous commencez par le bas et regardez les bandes (tirets noirs) afin de déterminer le séquençage du fragment d'ADN.

# Le séquençage de l'ADN

## Méthode de Sanger



Réaction avec le ddG	5' _____ A T C G									
	5' _____ A T C G G									
	5' _____ A T C G G T A C G									
Réaction avec le ddC	5' _____ A T C									
	5' _____ A T C G G T A C									
Réaction avec le ddA	5' _____ A									
	5' _____ A T C G G T A									
Réaction avec le ddT	5' _____ A T									
	5' _____ A T C G G T									
	5' _____ A T C G G T A C G T									

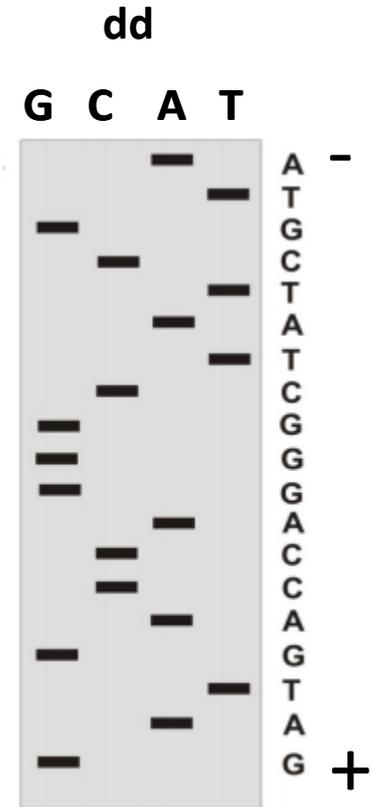
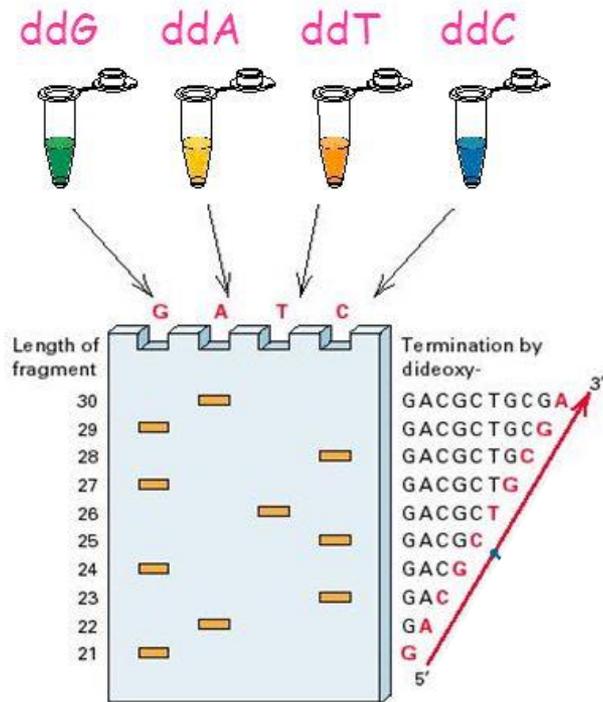


3' T G C A T G G C T A 5'

**Le brin complémentaire**

## Méthode de Sanger

### Méthode de Sanger



## Méthode de Maxam et Gilbert

Cette technique est pratiquement abandonnée de nos jours. Nous la décrirons brièvement pour des raisons historiques. Cette méthode, publiée parallèlement à celle de Sanger en 1977, par son caractère révolutionnaire a grandement contribué à l'histoire de la biologie moléculaire.

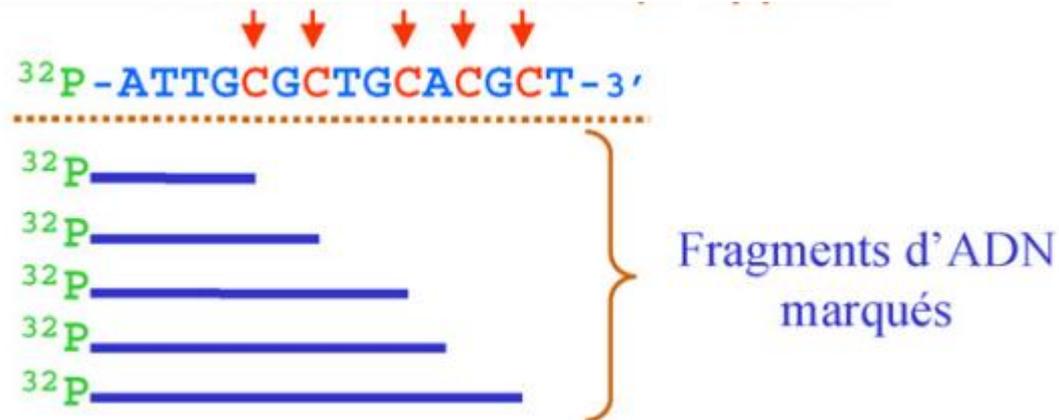
Il s'agit, d'une méthode chimique de séquençage. est basée sur une dégradation chimique de l'ADN et utilise les réactivités différentes des quatre bases G, C, [A +G] et [C+T] pour réaliser des coupures sélectives. Cette technique permettait d'analyser des fragments allant jusqu'à 500 pb. En reconstituant l'ordre des coupures, on peut remonter à la séquence des nucléotides de l'ADN correspondant. On peut décomposer ce séquençage chimique en six étapes successives :

- Marquage : Les extrémités des deux brins d'ADN à séquencer sont marquées par un traceur radioactif ( $^{32}\text{P}$ ). Cette réaction se fait en général au moyen d'ATP radioactif et de polynucléotide kinase.

# Le séquençage de l'ADN

## Méthode de Maxam et Gilbert

- Coupure. les ADN s sont soumis à des réactions chimiques spécifiques des différents types de base, l'ADN est clivé au niveau de la modification par réaction avec une base, par exemple, une réaction pour les G (alkylation par le sulfate de diméthyle), une réaction pour les G et les A (dépurination), une réaction pour les C, ainsi qu'une réaction pour les C et les T (hydrolyse alcaline).
- le produit de séquence est déposé sur un gel d'acrylamide, puis la séquence lue après autoradiographie. Cette analyse est analogue à celle que l'on effectue pour la méthode de Sanger.



## Méthode de Maxam et Gilbert

Immuno-analyse et biologie spécialisée (2008) 23, 260–279



Disponible en ligne sur [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



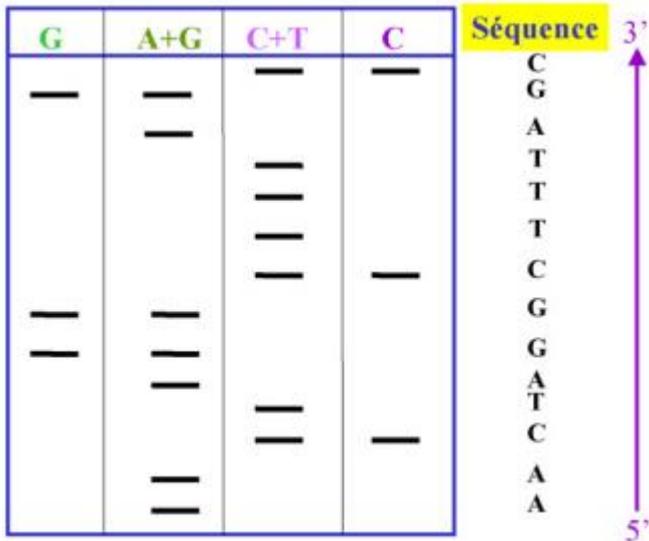
journal homepage: <http://france.elsevier.com/direct/IMMBIO/>



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

### Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one

J. Lamoril<sup>a,\*</sup>, N. Ameziane<sup>b</sup>, J.-C. Deybach<sup>a</sup>, P. Bouizegarène<sup>a</sup>, M. Bogard<sup>c</sup>



Séquence: 5' -AACTAGGCTTTAGC-3'

Merci

pour



votre

attention