

I. Extraction et purification d'ADN

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

- **Lyse cellulaire ou rupture de la membrane :** Les procédures de lyse courantes sont accomplies par des méthodes physiques (ex. : broyage ou lyse hypotonique), des méthodes chimiques (ex.: lyse détergente, agents chaotropiques, réduction des thiols) et la digestion enzymatique (ex.: protéinase K).
- La rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires peuvent être combinées.
- **Élimination des lipides :** L'élimination ou la séparation des lipides membranaires et des débris cellulaires se fait généralement à l'aide de détergents comme le sodium dodecyl sulfate (SDS) et par centrifugation.
- **Élimination des protéines de l'extrait cellulaire :** La dénaturation des protéines est effectuée à l'aide d'une protéase telle que la pronase ou la protéinase K. Après quoi, les protéines dénaturées sont séparées de l'extrait cellulaire.
- **Élimination de l'ARN :** l'ARN est éliminé par addition de RNase qui le dégrade rapidement en ribonucléotides.
- **précipitation/agrégation/élution de l'ADN:** la molécule d'ADN est précipitée par l'ajout de l'alcool éthylique absolu permettant la formation d'une pelote blanchâtre

I.1. Extraction et purification de l'ADN génomique chez les eucaryotes :

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

1) À partir d'un prélèvement sanguin humain (Méthode sans phénol/chloroforme) : Le sang prélevé sur tube EDTA est traité le même jour ou conservé à -20°C jusqu'à utilisation. 4 mL de sang sont transférés dans un tube Falcon et additionné de 11 mL d'une solution Tris EDTA (TE) 10 mM à pH 8. Le tube Falcon est mis dans un bac de glace pendant 30 minutes, puis centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes. Le culot est remis en suspension dans la même solution de TE et recentrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes. Cette opération d'élimination de l'hémoglobine est répétée plusieurs fois jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le Buffy coat obtenue représente une mince couche grisâtre de leucocytes et plaquettes d'un volume d'environ

2 mL. L'ADN génomique est extrait à partir de ce Buffy coat par la technique de Miller (1988) selon le principe du salting out.

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

Après un temps de séchage, l'ADN est solubilisé dans des tubes Eppendorfs contenant un volume de la solution du TE10/1 pH 8 sous agitation rotative à 37°C pendant 24 à 48h (Miller, 1988).

2) A partir d'extraits végétaux :

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

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

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

Lyse de la membrane cellulaire : comme il a été mentionné précédemment, la première étape de l'extraction d'ADN est la rupture de la cellule et de la membrane nucléaire. À cette fin, l'échantillon homogénéisé est tout d'abord traité avec le tampon d'extraction contenant de l'EDTA, du Tris/HCl et du CTAB. Toutes les membranes biologiques ont une structure générale commune comprenant des molécules de lipide et de protéines maintenues ensemble par des interactions non covalentes. Comme le montre la Figure 01, les molécules de lipides sont agencées sous forme de double couche continue dans laquelle les molécules de protéine sont « dissoutes ». Les extrémités des molécules de lipides se composent de « têtes » hydrophiles et de « queues » hydrophobes. Dans la méthode au CTAB, la lyse de la membrane est accomplie par le détergent (CTAB) contenu dans le tampon d'extraction. Comme la composition des lipides et celle du détergent sont semblables, le composant CTAB du tampon d'extraction a pour fonction de piéger les lipides qui constituent la cellule et la membrane nucléaire.

L'extraction : dans cette phase, les polysaccharides, les composés phénoliques, les protéines et les autres lysats cellulaires dissous dans la solution aqueuse sont séparés du complexe acide nucléique / CTAB. L'élimination des polysaccharides, ainsi que des composés phénoliques est particulièrement importante en raison de leur capacité à inhiber un grand nombre de réactions enzymatiques. Dans une concentration à faible teneur en sels ($< 0,5 \text{ M NaCl}$), les contaminants du complexe d'acide nucléique ne précipitent pas et peuvent être enlevés par l'extraction hors de la solution aqueuse au moyen de chloroforme. Ce dernier dénature les protéines et facilite la séparation des phases aqueuses et organiques. Normalement, la phase aqueuse constitue la phase supérieure. Mais si la phase aqueuse est dense, en raison de sa concentration en sels ($> 0,5 \text{ M}$), elle constituera la phase inférieure. L'acide nucléique aura, en outre, tendance à se dissoudre dans la phase organique si le pH de la solution aqueuse n'a pas été équilibré comme il se doit à une valeur de pH comprise entre 7,8 et 8,0. Au besoin, l'extraction au chloroforme est répétée deux ou trois fois afin d'enlever complètement les impuretés de la couche aqueuse. Pour parvenir à la meilleure récupération possible de l'acide nucléique, une rétroextraction de la phase organique peut être réalisée à l'aide d'une solution aqueuse qui est ajoutée ensuite à l'extrait précédent. Une fois que le complexe d'acide nucléique a été purifié, la dernière étape de la procédure peut être accomplie. Il s'agit de la précipitation.

Précipitation : à ce stade final, l'ADN génomique est libéré du détergent. À cette fin, la solution aqueuse est tout d'abord traitée à l'aide d'une solution de précipitation composée d'un mélange de CTAB et de NaCl à concentration élevée ($> 0,8$ M NaCl). Le sel est indispensable à la formation d'un précipité d'acide nucléique. L'acétate de sodium peut être préféré au NaCl pour sa capacité de tamponnage. Dans ces conditions, le détergent, qui est plus soluble dans l'alcool que dans l'eau, peut être élué, tandis que l'acide nucléique (ADN) précipite. Le traitement successif par 70% d'éthanol permet une purification ou élution supplémentaire des sels résiduels

I.2. Extraction et purification de l'ADN génomique chez les procaryotes :

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

1) Lyse cellulaire et dénaturation des protéines :

Dans un tube à centrifuger en polypropylène, 3mL de culture d'E.coli sont introduit puis Centrifugé 5minutes à 150 g, le culot est dissolu dans 2,5 mL de tampon S.E (saline-EDTA, pH=8). Une solution de lysozyme de 0,15 mL est ajouté et incubé 30 minutes à 37°C puis ajouter 0,2mL de SDS. Le mélange est incubé 10 minutes à 60°C, puis refroidi dans la glace jusqu'à température ambiante. 0,60mL de NaClO₄ sont ajouté lentement et mélangé par agitation douce (Nicolas et Daniel, 2000).

2) Extraction au phénol :

Un volume de 3,5mL de phénol saturé est mélangé par retournements successifs pendant 5 minutes de manière à maintenir une émulsion. Le tube est ensuite centrifugé à 16000 x g pendant 5 min à température ambiante pour séparer la phase aqueuse de la phase phénolique. La phase aqueuse supérieure, qui contient l'ADN génomique est récupérée dans un nouveau tube, puis traitée de la même façon avec un mélange phénol/chloroforme. Après ce dernier traitement la seconde solution aqueuse obtenue est additionné avec 100µg de RNase par mL, puis le mélange est incubé 15 minutes à 37°C. Une autre extraction par le mélange phénol/chloroforme est nouvellement appliquée, la phase aqueuse récupérée est mélangé avec le même volume de

chloroforme afin d'éliminer toute trace de phénol. Le tube est ensuite centrifugé à 16000 x g pendant 5 min à température ambiante pour séparer la phase aqueuse de la phase organique (Nicolas et Daniel, 2000).

3) Concentration de l'ADN par précipitation à l'éthanol

2,5 volumes d'éthanol à 95% et un volume V d'acétate de sodium à une concentration finale de 0,3 M sont ajoutés à un volume de la phase aqueuse, le mélange est incubé 30 minutes à - 20°C, puis centrifugé 15 minutes à 12000 g. Le culot obtenu est lavé par une solution d'éthanol à 70%. Centrifuger à nouveau 5 minutes à 12000 g et éliminer le surnageant, le culot est séché afin d'éliminer les traces d'éthanol. Le précipité est dissout dans 0,5mL de SSC (sodium saline citrate) (Nicolas et Daniel, 2000).

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

1. Purification par Lyse alcaline :

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

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

2. Purification par Gradient de chlorure de césium :

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

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

II. Les techniques d'extraction de L'ARN

1. Méthodes d'extraction et de purification des ARN totaux :

Initialement, toutes les préparations d'ARN impliquaient la lyse totale des cellules avec des détergents forts et/ou du phénol et du tampon. Cela provoque une lyse immédiate des cellules mais également une inactivation des RNases cellulaires en raison de l'action dénaturante du détergent et du phénol. des sels dénaturants puissants sont utilisés tels que le guanidinium HCl ou le thiocyanate de guanidinium (Chirgwin et al., 1979; Ullrich et al., 1977). La figure 9 montre un procédé couramment utilisé pour l'isolement de l'ARN cellulaire total (Greene, 1998).

Les cellules ou tissus cultivés sont lysés dans une solution de guanidinium. Le lysat est ensuite appliqué sur un gradient graduel avec une couche inférieure contenant 5,7 M de CsCl, qui dépasse la densité de l'ADN mais pas celle de l'ARN. Lorsque ceci est centrifugé pendant 18h, l'ADN contaminant est piégé à l'interface entre le lysat et le CsCl haute densité, l'ARN traversant la couche de CsCl et les granules au fond. Ceci est simplement une étape de fraction qui réalise une purification initiale de l'ARN. Le culot d'ARN est ensuite récupéré, extrait avec du phénol chloroforme pour éliminer les protéines résiduelles, puis précipité. Si une petite quantité de CsCl est dissoute dans le lysat (1 g / 1,5 ml de lysat), ceci ajoute une densité suffisante au lysat pour que les protéines s'accumulent sous la forme d'une bande dénaturée au sommet. Cette procédure peut également être utilisée pour préparer un ADN chromosomique piégé à l'interface entre un CsCl de basse et haute densité (Greene, 1998).

III. Electrophorèse et analyse de l'ADN digéré par des enzymes de restriction

Introduction

Les êtres vivants eucaryotes ou procaryotes contiennent dans la plus parts des génomes fragmentés : chromosomes et plasmides bactériens ; chromosomes nucléaires, génomes chloroplastiques et mitochondriaux, virus...etc. L'étape préliminaire dans l'étude d'un génome peut être de le résoudre en ses composants. Il existe plusieurs techniques pour analyser de façon globale la structure des génomes et les fractionner en leurs composants. Parmi les techniques les plus courantes en biologie moléculaire est l'électrophores sur gels d'Agarose ou de polyacrylamide (Callen et Perasso, 2005).

I. Électrophorèse : définition et principe de la technique

Le terme électrophorèse vient de : électroce qui signifie énergie électrique et de phoresis (photo en grec) qui veut dire porter, avoir en soi.

L'électrophorèse technique de biologie moléculaire permet de séparer des fragments d'ADN linéaires de différente taille selon le principe du tamisage moléculaire. Les molécules d'une taille comprise entre quelques centaines de paires de base et une vingtaine de kilo bases ont une mobilité approximativement inverse au logarithme de leur taille : c'est la méthode de choix pour déterminer la taille de fragments de restriction par référence à un standard de fragments d'ADN de mobilité connue (Tagu et Moussard, 2003; Callen et Perasso, 2005).

Le principe est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement à pH7~8 (à cause de l'ionisation de leurs groupements phosphate), vers l'anode (+) sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel en fonction de la taille des molécules. Deux principaux polymères sont utilisés: l'agarose et le polyacrylamide (Tagu et Moussard, 2003; Callen et Perasso, 2005).

L'agarose est un polysaccharide formé d'alpha et de bêta-galactoses, extrait des algues rhodophytes des genres Gellidium et Gracillaria (Imerson 2011). Il forme un gel solide lorsqu'il est dissout dans une solution aqueuse à des concentrations entre 0,5% et 2% (W/V) . L'agarose utilisé pour l'électrophorèse est une forme plus purifiée de l'agar utilisé pour les plaques de la culture bactérienne (Nussinovitch, 1997; Nussinovitch, 2010).

Les fragments de taille inférieure à la centaine de pb sont séparés sur des gels plus fortement réticulés, gels d'acrylamide utilisés en particulier pour le séquençage.

Le gel de polyacrylamide est constitué d'acrylamide de formule brute C_3H_5NO (extrêmement neurotoxique par ingestion ou contact avec la peau) qui est l'unité de base et de bisacrylamide qui est l'agent portant. Les taux de ces deux substances sont variés afin d'obtenir différents maillages et donc différentes densités de gel variant de 4% à 20% (poids/volume). La polymérisation est réalisée grâce à l'ajout de deux réactifs: le TEMED (N,N,N',N'tetra-méthyl-éthylènediamine) et l'ammonium persulfate qui deviennent des anions hyperactifs en présence de lumière (Rosenberg ,2006; Maurer, 2011).

L'ADN est visualisé à l'aide de bromure d'éthidium, qui s'insère entre les plateaux de base adjacents et fluoresce dans le rouge orangé quant on l'excite avec une lumière de longueur d'onde inférieure à 300nm.

II. Analyse de l'ADN digéré par des enzymes de restriction :

La digestion de l'ADN génomique ou plasmidique pour des fins analytiques ou préparatoires est effectuée grâce aux enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont des endonucléases synthétisées par des bactéries pour se protéger des infections de virus (bactériophages). Ces enzymes coupent l'ADN viral à des endroits spécifiques. Ce mécanisme de résistance aux bactériophages, dénommé restriction, fut étudié par W. Arber à l'Université de Genève dans les années 60. Il obtint avec D. Nathans et H. Smith le prix Nobel de Médecine en 1978 pour la découverte et les applications des enzymes de restriction.

Les systèmes de restriction/ modification apparaissent dans différentes espèces bactériennes comme mécanisme de défense. Ils sont composés de deux constituants : le premier est l'endonucléase de restriction qui reconnaît une courte séquence d'ADN symétrique et hydrolyse le squelette de l'ADN dans chaque brin à un site spécifique à l'intérieur de cette séquence. Ainsi l'ADN étranger sera dégradé en fragments relativement courts. Le second constituant du système est une méthylase, qui ajoute un groupement méthyle à la base A ou C à l'intérieur des mêmes séquences de reconnaissance dans l'ADN cellulaire. Cette modification permet à l'ADN hôte de résister à la dégradation grâce à l'endonucléase.

IV Transformation de bactéries

Les bactéries sont des procaryotes et leur génétique n'obéit pas au schéma Mendélien classique des eucaryotes. Tout d'abord parce qu'elles sont haploïdes et ne subissent pas de méiose. Toutefois, ceci ne signifie pas qu'elles ne présentent jamais de recombinaison génétique ou de transfert de gènes entre individus ; elles disposent en fait d'un grand nombre de mécanismes qui permettent le transfert des gènes.

Il est possible de transférer *in vitro* de l'ADN extrait d'une culture bactérienne jusqu'à une bactérie receveuse. Ce processus s'appelle transformation.

La transformation de bactéries fut décrite la première fois par Fred Griffith en 1928, montrant qu'une souche non virulente, non capsulée et rugueuse du *Streptococcus pneumoniae* pouvait être convertie en une souche virulente, encapsulée et douce après ajout de cellules douces tuées par la chaleur. Oswald Avery et son équipe démontra, dans les années 1930, que le

« principe transformant » était l'ADN et non les protéines de la cellule. Ils ont eu beaucoup de chance dans le choix de micro-organisme expérimental car seulement quelques espèces sont naturellement capables de prendre l'ADN de l'environnement : le *Streptocoque*, le *Bacillus*, le *Neisseria*, l'*Haemophilus* et certaines espèces d'Archaébactéries.

I. État de la compétence des bactéries transformant :

Toutes les espèces d'un genre ne sont pas nécessairement capables de se transformer, ni toutes les cellules d'une population. La capacité d'une cellule bactérienne à prendre l'ADN est liée au développement d'un état compétent où des récepteurs d'ADN et des protéines spécifiques à la transformation sont présents à la surface de la cellule, permettant à un fragment d'ADN d'entre en contact avec la cellule compétente, ce fixer et y pénétrer (Figure 12). Par exemple, chez le *Neisseria gonorrhoeae*, seules les cellules pilées sont compétentes (Dale, 1998 ; Nicklin et al., 2000 ; Dale et Park, 2010).

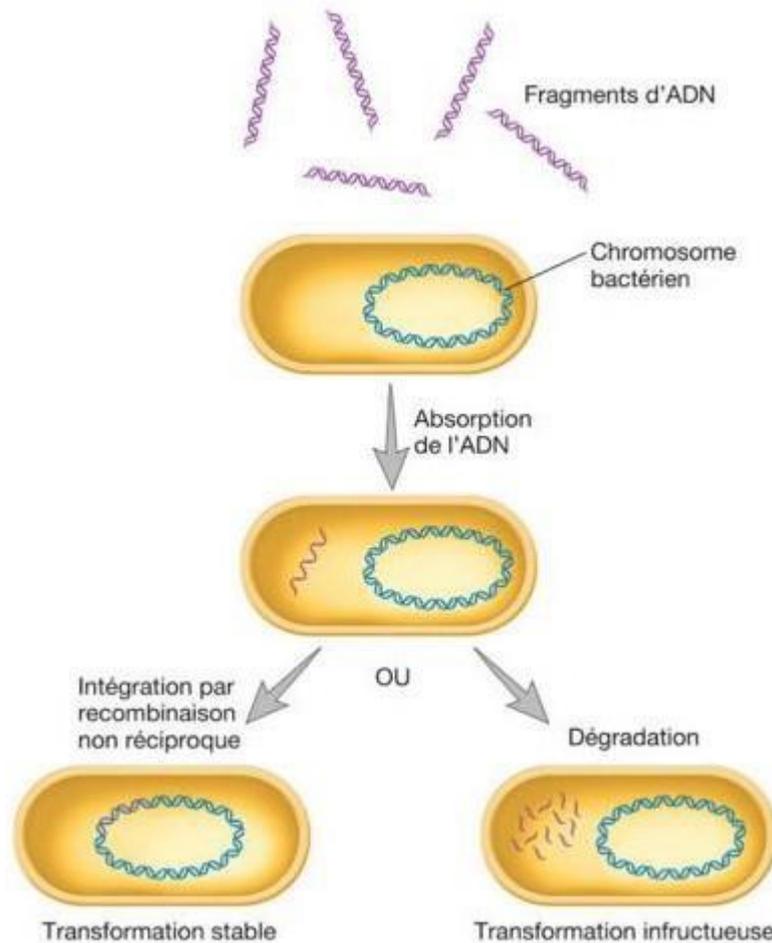


Figure 12 : Transformation par des fragments d'ADN (Willey et al., 2017).

La compétence dépend généralement des conditions de la croissance. Cette compétence peut être acquise par seulement quelques cellules dans une culture (*B. subtilis*) ou par presque toutes les cellules (*S. pneumoniae*), cela dépend du genre. La compétence peut être perdue pendant quelques minutes (*S. pneumoniae*) ou plusieurs heures (*B. subtilis*). Certaines espèces

naturellement non transformables peuvent être poussées à devenir compétentes par exemple *E. coli* en utilisant des traitements chimiques, cette compétence n'est pas identique à la compétence naturelle (Dale, 1998 ; Nicklin et al., 2000 ; Daleet Park , 2010).

II. Transformation naturelle :

La transformation naturelle est un processus à plusieurs étapes (Figure 13). L'ADN double brin doit d'abord se lier à une cellule compétente. Un brin est ensuite hydrolysé alors que le second brin intact est transféré dans la cellule. Le fragment simple brin

arrivant interagit avec des protéines qui intègrent l'ADN dans le chromosome du receveur par recombinaison homologue (Willey et al., 2017).

En dépit de la différence dans l'architecture de la paroi cellulaire, les bactéries Gram-négatif, utilisent des protéines semblables comme principaux composants de leur machinerie d'absorption d'ADN. Ces protéines sont apparentées à celles employées dans les systèmes de sécrétion de type II et pili de type IV. Les principales différences proviennent du besoin des bactéries Gram-négatif de transporter l'ADN double brin à travers la membrane plasmique (Figure 14). Bien que connaissant la machinerie de base, les scientifiques n'ont toujours pas déterminé le mécanisme précis par lequel l'ADN entre dans la cellule ou comment chaque composant interagit avec l'ADN. Comment ce processus consommateur d'énergie est approvisionné est aussi peu clair pour de nombreuses bactéries. Chez les bactéries Gram-négatif appartenant à l'espèce des Firmicutes (ex. *Bacillus*, *Streptococcus*, et *Enterococcus*), une translocase ATP-dépendante (ComFA) a été identifiée (Willey et al., 2017).

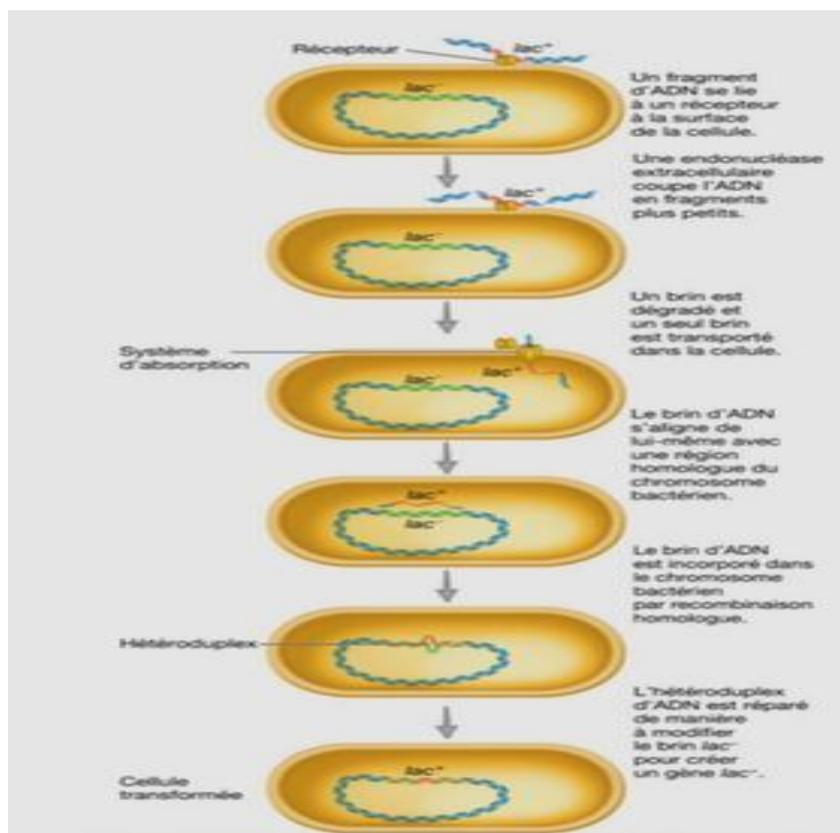


Figure 13 : La transformation bactérienne comme vue chez *Streptococcus pneumoniae* (Willey et al., 2017).

III. Transformation de bactéries rendues compétente par un traitement au chlorure de calcium :

Les généticiens des microbes tirent avantage de la transformation pour faire entrer l'ADN (habituellement de l'ADN recombinant) dans les cellules. Cependant, comme noté précédemment, beaucoup d'espèces, dont *E. coli*, ne sont pas naturellement compétentes pour la transformation. Ces bactéries peuvent être rendues compétentes artificiellement par certains traitements. L'électrochoc et l'exposition au chlorure de calcium (CaCl_2) sont deux techniques couramment employées. Ces deux approches rendent la membrane cellulaire plus perméable à l'ADN et toutes deux ont été utilisées pour préparer des cellules d'*E. coli* artificiellement compétentes. Pour augmenter la fréquence de transformation chez *E. coli*, on emploie des souches qui manquent d'une ou de plusieurs nucléases. Ces souches sont particulièrement importantes lorsqu'on transforme les cellules avec de l'ADN linéaire, qui est sensible à l'attaque des nucléases. Il est plus facile de transformer des bactéries avec de l'ADN plasmidique, parce que les plasmides peuvent se répliquer dans leur hôte, et ne sont pas aussi aisément dégradés que les fragments linéaires (Willey et al., 2017).

III.1 Préparation des cellules compétentes :

Le protocole de transformation utilisée est une modification de la procédure de Chang et al. (2017) en se basant sur le protocole classique rapporté par Bergmans et al. (1981).

Les cellules à traités ont été préalablement mis culture jusqu'à leur phase exponentielle de croissance, car dans cette phase les cellules sont en division ce qui facilitera la transformation. Ensuite, la culture *E. coli* est centrifugée pendant 10 minutes à 2500 rpm afin de concentrer les cellules

Le culot est re-suspendus dans un tampon Tris HCl et CaCl_2 afin de les rendre compétentes pour la transformation. En effet, en présence d'une solution concentré en ions Ca la structure des membranes cellulaire va être altéré et il y aura la création de plusieurs micro perforations par lesquels l'ADN pourra pénétrer les cellules vont être capables d'ingérer des petites molécules d'ADN, comme un plasmide. Toutes les opérations ont été effectuées à 4°C a fin de ne pas endommager les bactéries.

III.2 Transformation des cellules compétentes

Dans cette étape les cellules d'E.coli rendues artificiellement compétente sont mélangées avec de l'ADN plasmidique, le mélange est laissé reposer pendant 30 minutes afin d'accentuer la réaction précisée précédemment. Ce mélange est incubé 1 minute à 42°C, ce choc thermique induit un stress important qui fragilise la membrane et facilitera l'entrée de l'ADN plasmidique dans les cellules d'E.coli compétentes. Une fois cette étape terminée le tube est remis dans la glace afin d'effectuer un deuxième choc thermique qui lui permettra d'intégrer le plasmide dans la cellule. Du milieu Soc est ajoutée au tube afin de régénérer la membrane bactérienne au plus vite. Les tubes sont agités à 37°C pendant 45 minutes ce qui a permis de continuer la régénération de E.coli à sa température optimal .Cette étape a également permis d'obtenir la synthèse de la protéine qui confère la résistance à l'antibiotique. Enfin, les cellules transformées sontensemencées sur un milieu LB solide additionné d'antibiotique afin d'identifier celles qui contiennent l'ADN plasmidique (Chang et al., 2017).

V. La PCR et la RTPCR

V-1 La PCR

I. La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR :

Cette technique a été mise au point par le scientifique américain Kary Mullis en 1983 et développée par le H.A. Herlich avec la collaboration du laboratoire Cetus Corp à Emery ville, Californie en 1985 (Ronsin, 2005).

La polymérase chaîne réaction ou PCR est une technique de répliation ciblée in vitro, Elle permet d'obtenir à partir d'un échantillon d'ADN génomique complexe appelée séquence cible de petite taille, d'importantes quantités d'ADN spécifique et de longueur définie. Le seul impératif est de connaître une partie de la séquence aux deux extrémités de la région à copier. L'ADN cible est ainsi amplifié plus d'un million de fois et devient la molécule d'ADN majoritaire dans le milieu réactionnel. La quantité obtenue finalement est suffisante pour pouvoir manipuler le gène amplifié ou en faire des analyses détaillées (Winter et al., 2000 ;Turner et al.,2000).

II. Eléments utilisés dans la PCR :

□ L'ADN matrice : il contient la séquence d'ADN cible à amplifier.

□ Amorces d'oligonucléotides : la PCR requiert une paire d'amorce oligonucléotides. Ce sont des petites molécules d'ADN simple brin généralement 20 bases obtenues par synthèse chimique. Les séquences d'amorces sont choisies sur la base d'appariement complémentaire aux brins d'ADN opposés de chaque côté de la séquence qu'on désire amplifier.

□ Une ADN polymérase : L'enzyme communément utilisée est la Taq ADN polymérase de *Thermus aquaticus*, une bactérie vivant dans des milieux chauds. Le rôle de l'ADN polymérase en PCR est copier les molécules de l'ADN. L'enzyme en présence d'amorces se fixe à l'ADN simple brin et synthétise un nouveau brin complémentaire du brin d'origine.

□ Des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) : Ces molécules représentent les quatre bases de l'ADN (guanine, adénine, cytosine, thymine) nécessaire dans toute PCR et qui sont utilisés par l'ADN polymérase pour la synthèse du nouvel ADN (Winter et al., 2000).

III. Cycle de PCR :

La technique de PCR permet d'amplifier de manière exponentielle une région bien précise du génome. Des oligonucléotides simple brin sont synthétisés et s'hybrident avec la région homologue de l'ADN. La réaction de polymérisation s'effectue en trois étapes qui se déroulent à différentes températures et aboutissent ensemble à la synthèse de l'ADN cible (Figure 15) (Winter et al., 2000 ;Turner et al.,2000).

□ Dénaturation :

La première étape s'effectue à une température de 94°C, dite température de dénaturation. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la réplication, est dénaturé

: les liaisons hydrogène ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C et les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténares) (Winter et al., 2000 ;Turner et al.,2000).

□ Appariement des amorces ou hybridation :

La deuxième étape s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 60°C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température

permet aux liaisons hydrogènes de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences monocaténares complémentaires de régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique. La température d'hybridation est déterminée par la séquence et le nombre de bases dans les amorces (compter grossièrement +4 par G-C et +2 par A-T) (Winter et al., 2000 ;Turner et al.,2000).

La température d'hybridation (T_h) d'une amorce est en déduite à partir de la formule de Wallace pour la T_m (température de fusion):

$$T_m = 4(C+G) + 2(A+T) ; T_h = T_m - 5 \text{ en } (^\circ\text{C})$$

□ Elongation :

La troisième étape s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. À 72°C, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées (Winter et al., 2000 ;Turner et al.,2000).

$$N = (2^n - 2^n) \times$$

Un totale de 20 à 40 cycles est mené à bien, en fonction de l'abondance initiale de la séquence cible. Afin de programmer les changements de températures nécessaires, la PCR se déroule dans un bloc de chauffage contrôlé électriquement appelé cycleur thermique ou thermocycleur.

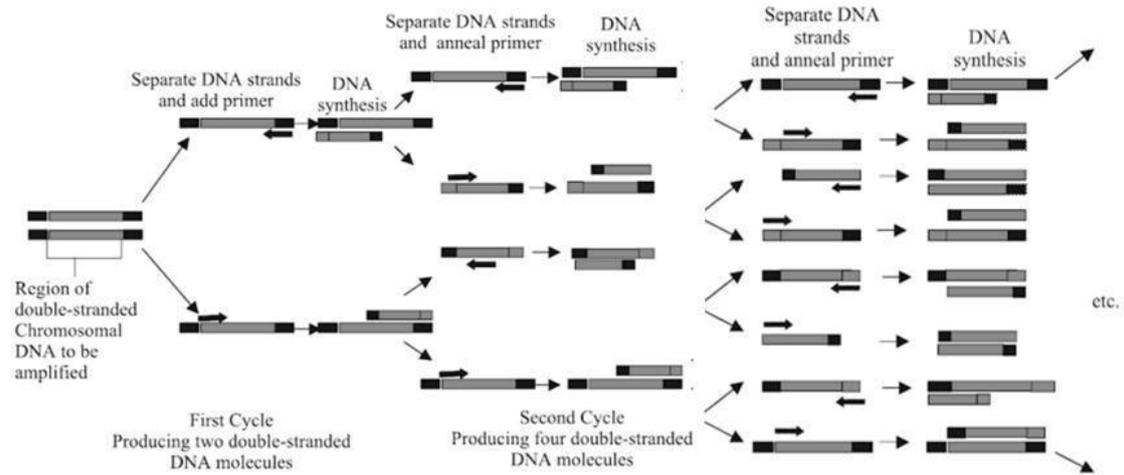


Figure 15 : La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Tripathi, 2010).

IV. Quantification de l'amplicon :

Cette amplification a un caractère exponentiel puisque la quantité d'ADN obtenue à la fin de chaque cycle est le double de celle présente au début du cycle. Ainsi, l'amplification, en tant que nombre final de copies de la séquence cible, est exprimée par l'équation suivante:

Où n est le nombre de cycles, 2^n est le premier produit obtenu après le premier cycle et le deuxième produit obtenu après le deuxième cycle avec une longueur indéfinie, et x est le nombre de copies de la matrice originelle (Poitras et Houde, 2002).

V. Applications de la PCR :

La PCR est utilisée en routine comme outil de recherche et elle a permis d'améliorer la capacité d'étude des gènes. En fait, de nombreuses études en génétique moléculaire impliquent l'utilisation de la PCR à une étape au moins, normalement comme élément de la stratégie globale et en association avec d'autres techniques. Par exemple, de l'ADN amplifié par PCR peut être utilisé pour le séquençage, comme sonde dans du southern blot ou du northern blot.

La PCR est utilisée dans la plupart des domaines de la biologie et de la médecine, mais également dans d'autres domaines exceptionnels, comme l'anthropologie ou l'archéologie. C'est aussi un outil dans les industries des biotechnologies (Winter et al., 2000). La PCR a apporté d'importantes contributions aux domaines suivants (Erich, 1989 ; DennisLo et al., 2006 ; Bustin, 2010) :

- les maladies héréditaires
- la recherche contre le cancer
- les sciences médico-légales
- les biotechnologies

V-2 La RT-PCR

I. Principe de la Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) :

La RT-PCR est une variante extrêmement utile de la PCR standard qui permet l'amplification de transcrits d'ARNm spécifiques à partir de très petits échantillons biologiques. C'est la méthode la plus sensible pour détecter les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule.

Le principe consiste à extraire les ARN totaux des tissus étudiés et de les copier in vitro en ADNc simple-brin, grâce à l'action de la transcriptase inverse. Les molécules d'ADN obtenues servent de matrice à une réaction de PCR. Les fragments PCR obtenus après les cycles de PCR sont visualisés par électrophorèse sur gel (Figure 16). L'une des difficultés de la technique est la contamination de la préparation des ARNs par l'ADN génomique ; en effet, les amorces se fixeront tout aussi bien sur l'ADN simple-brin issu des ARNs que sur l'ADN génomique contaminant. L'une des possibilités est de travailler à partir d'ARN polyadénylés purifiés. Il est aussi possible d'éviter cet artefact en traitant les échantillons d'ARN par une désoxynucléase afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique (Tagu, 1999).

De manière pratique, les dNTP, le tampon, la Taq polymérase, les amorces oligonucléotidiques, la transcriptase inverse (RT) et la matrice d'ARN sont ajoutés ensemble dans le tube réactionnel. La réaction est incubée à 37 ° C, ce qui permet à la RT de fonctionner et permet la synthèse d'une copie d'ADNc, une PCR standard est effectuée pour amplifier le produit d'ADNc, conduisant à la synthèse du second brin, puis à un double brin. Le choix de l'amorce pour la synthèse du premier brin dépend de l'expérience. Si une amplification de tous les ARNm dans l'extrait cellulaire est nécessaire, alors une amorce oligodT qui hybridait toutes les queues poly A peut être utilisée. Si un ADNc spécifique est recherché, une amorce spécifique à la région

codante peut être utilisée avec succès, sinon une amorce aléatoire (random primer) pourrait être ajoutée (Walker et Rapley, 2009).

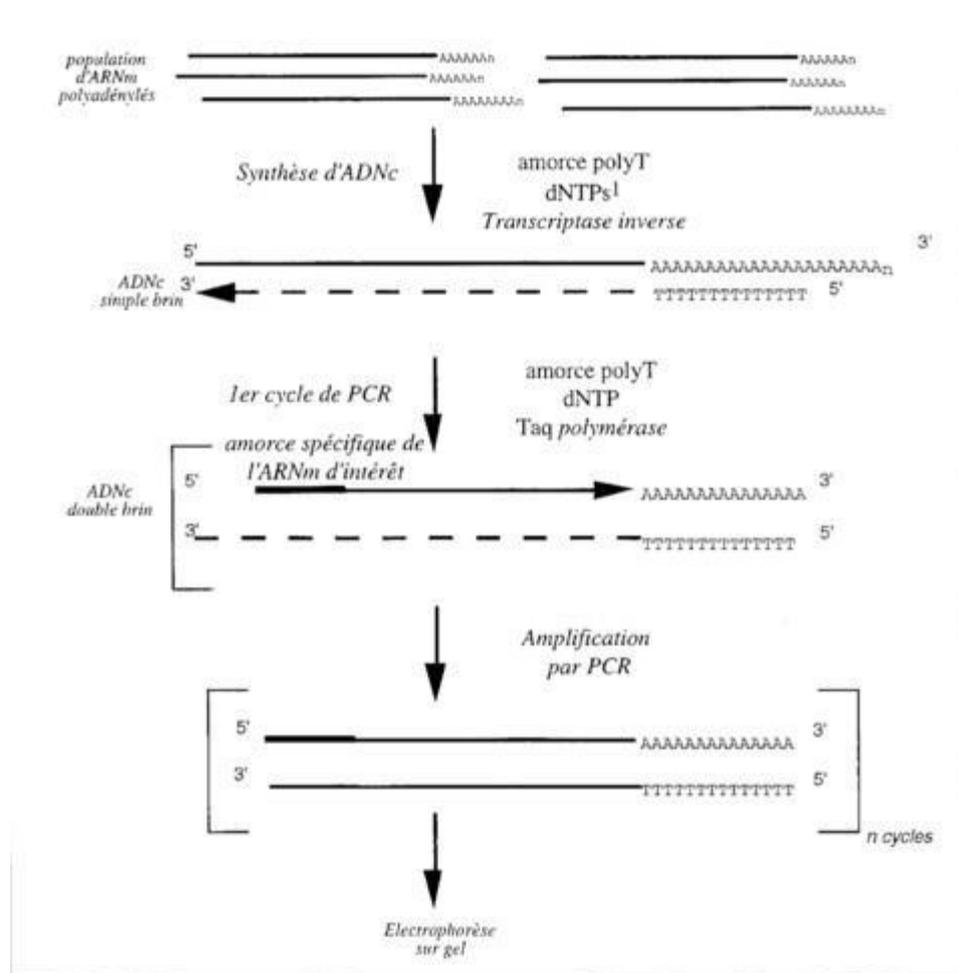


Figure 16 : Principe de la RT-PCR (Tagu, 1999).

II. Application de la RT- PCR :

La Reverse Transcription-PCR constitue une technique très sensible dans laquelle un nombre faible de copies de molécules d'ARN peut être détecté. Elle est largement utilisée dans le diagnostic des maladies génétiques et, semi-quantitativement, dans la détermination de l'abondance de différentes molécules d'ARN spécifiques dans une cellule ou un tissu afin de mesurer l'expression génique. Elle trouve aussi son application dans les domaines suivant :

- Méthodes de recherche : Par exemple, Lin et al. utilisèrent la qRT-PCR pour mesurer l'expression des gènes Gal dans des cellules de levure (Lin et al., 2011).

□ Insertion de gènes : La RT-PCR peut également être utilisée pour insérer des gènes eucaryotes dans des êtres procaryotes. Elle est couramment utilisée dans l'étude des génomes de virus à ARN, tels que le virus de l'influenza A et VIH (Quinlivan et al., 2005; van der Kuyl et Berkhout, 2012) .

□ Diagnostic des maladies génétiques : telles que le syndrome de Lesch-Nyhan (Nguyen et al., 2012). Peut également être utilisé comme test pour la grippe aviaire - H7N9 (FAO, 2014)

□ Détection et étude du cancer : utiliser la RT-PCR dans la détection du cancer pour améliorer le pronostic et surveiller la réponse au traitement (Li et al., 2003; Li et al., 2006; Bremnes et al., 2005).

VI Techniques de clonage, de séquençage

VI-1. Techniques de clonage

Introduction :

Le terme clone est utilisé pour la première fois en 1903 par le botaniste H.J. Webber en désignant des plantes reproduites par multiplication asexuée. Ce mot sera ensuite réutilisé par J.B.S. Haldane.

Le clonage désigne principalement le processus de multiplication d'un organisme, d'une cellule souche ou d'un gène, en grand nombre d'exemplaires identiques. Depuis plus de vingt ans, le clonage, ou la reproduction exacte de gènes particuliers et de types individuels de cellules, est une technique employée en biotechnologie afin de produire des médicaments et des vaccins pour traiter plusieurs maladies (Cottier et Guerry, 2000). On nomme ces deux types de clonage :

□ Le clonage cellulaire: On fait plusieurs exemplaires de la même cellule pour pouvoir faire des recherches médicales.

□ Le clonage moléculaire le quel on développera particulièrement dans ce chapitre.

I. Clonage moléculaire :

Le clonage de l'ADN est une technique puissante qui permet de séparer des séquences spécifiques d'ADN au sein d'autres séquences puis de les copier de sorte qu'on obtient des quantités importantes permettant une analyse détaillée ou des manipulations. Une

importante utilisation du clonage de l'ADN est d'isoler de nouveaux gènes en leur permettant d'être explorés et caractérisés.

Toutes les expériences de clonage de l'ADN reposent sur la construction de molécules d'ADN recombinant. Ceci suppose de joindre ensemble différentes molécules d'ADN. La molécule d'ADN à cloner est insérée dans une autre molécule d'ADN généralement circulaire, appelée un vecteur. Le vecteur recombinant est introduit dans une cellule hôte, généralement la bactérie E.coli, où il produit de multiples copies de lui-même. Lorsque la cellule hôte se divise, des copies du vecteur sont ainsi produites et elles peuvent être purifiées à partir des cultures de cellules hôtes et utilisées pour l'analyse de l'insert d'ADN étranger (Winter et al., 2000 ; Tagu et Moussard ,2003 ; Walker et Raply, 2009).

II. Outils de clonage :

II.1. Les enzymes de restriction :

Joindre les molécules d'ADN ensemble pour le clonage dépend de l'utilisation d'enzymes de bactéries appelées endonucléases de restriction. Ces enzymes coupent les molécules d'ADN au niveau de séquences spécifiques, généralement 4 à 8 bases. Les séquences reconnues sont des palindromes. Ceci signifie que la séquence est la même lorsqu'on la lit dans le sens 5' vers 3' sur les deux brins. Chaque enzyme a une séquence cible spécifique. Par exemple, l'enzyme EcoRI, qui est issue de la bactérie E.coli coupera n'importe quelle molécule d'ADN pourtant la séquence GAATTC. Les autres endonucléases de restriction reconnaissent des séquences différentes. La coupure réalisée par l'enzyme de restriction n'est généralement pas franche, c'est-à-dire que les deux brins de la double hélice sont coupés à quelques bases de distance. Ceci crée des portions simples brins qui dépassent, et qu'on appelle extrémités cohésives ou bouts collants. Certaines enzymes de restriction coupent l'ADN en laissant dépasser une extrémité 5' et d'autres laissant dépasser une extrémité 3'. Il existe des enzymes qui coupent de façon franche les deux brins au même endroit (Figure 17). Noter que même lorsque les molécules sont jointes par des extrémités cohésives, elles ne sont pas liées de façon covalente. Une enzyme appelée ADN ligase, est utilisée pour catalyser la formation d'une liaison phosphodiester entre deux molécules d'ADN, les recombinant ainsi de façon permanente. Il existe plusieurs systèmes pour cloner des molécules

d'ADN, en fonction du type de vecteur utilisé. Chacun présente ses propres caractéristiques et utilisations (Winter et al., 2000) .

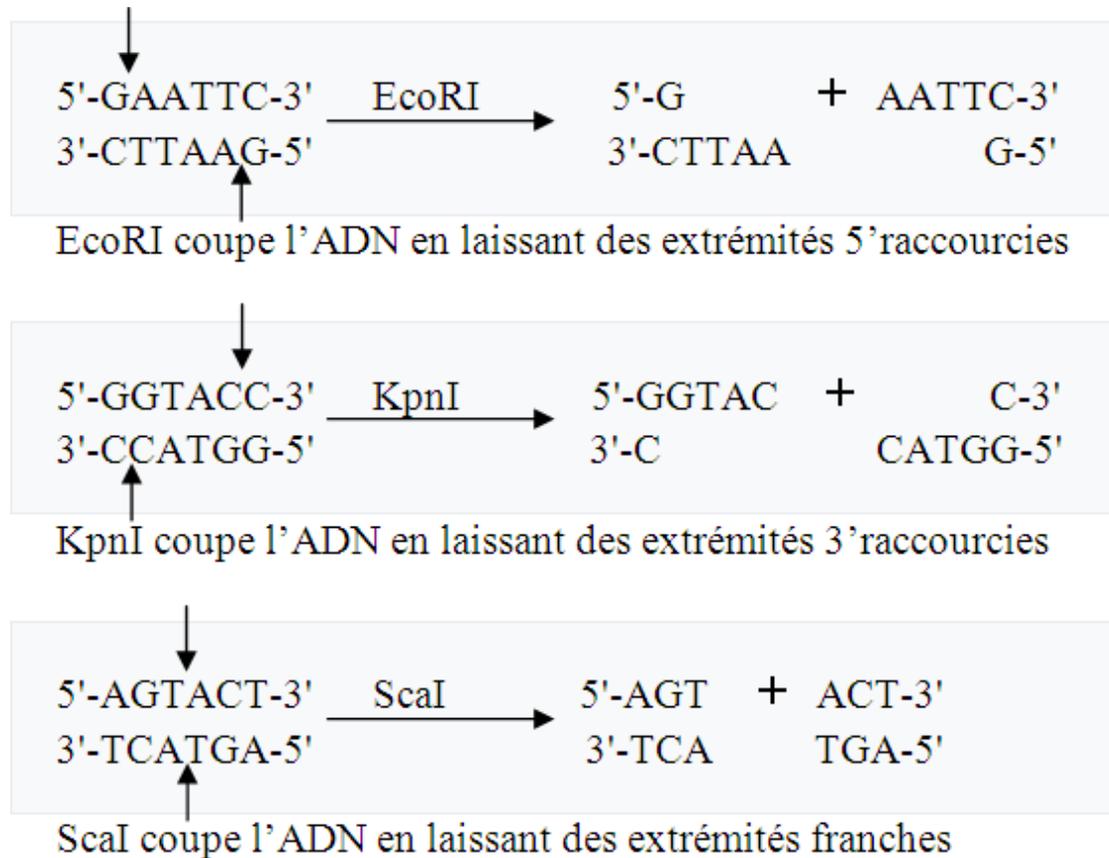


Figure 17 : Action d'enzymes de restriction sur l'ADN.

II.2. Procédure de clonage selon les vecteurs utilisés :

II.2.1. Plasmide :

Les plasmides forment le type le plus commun de vecteur de clonage. La procédure de clonage peut être divisée en plusieurs étapes comme suit (Figure 18) (Winter et al., 2000 ; Walker et Raply, 2009) :

- Le plasmide est digéré par une enzyme de restriction qui le coupe en un site unique et transforme la molécule circulaire qu'il était en une molécule linéaire avec des extrémités cohésives.
- L'ADN étranger à cloner est lui aussi digéré par la même enzyme de restriction pour produire les mêmes bouts collants,

Chapitre 6 : Méthode de biologie moléculaire

- Le plasmide et l'ADN étranger sont mixés, des molécules plasmides sont jointes à des molécules d'ADN étranger via leurs extrémités cohésives communes et on obtient des plasmides recombinants circulaires,
- L'ADN ligase est utilisé pour joindre de façon covalente les deux,
- Le plasmide recombinant est introduit dans la bactérie hôte (généralement *E. coli*) par un processus appelé transformation,
- Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur des plaques d'agar et les colonies des bactéries composées de cellules ayant correctement intégré le plasmide recombinant croissent,
- Des colonies individuelles sont séparées et cultivées en milieu liquide. De grandes quantités de plasmides peuvent alors être purifiées à partir des cultures et on peut récupérer l'ADN cloné pour l'analyse (Winter et al., 2000 ; Walker et Raply, 2009).

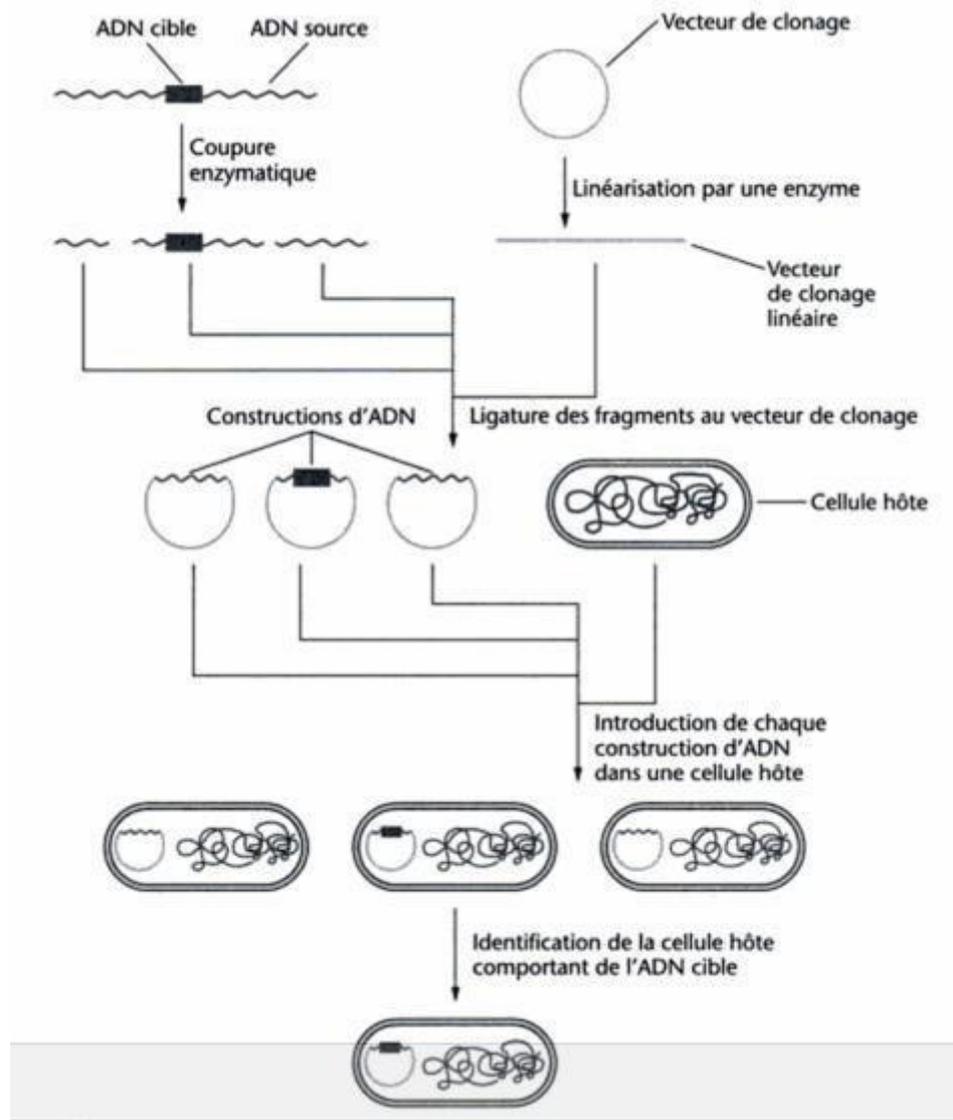


Figure 18 : Représentation schématique du clonage d'ADN via des plasmides (Pasternak, 2003).

II.2.2. Le phage lambda (λ) :

Le phage λ a été adapté à une utilisation comme vecteur de clonage. La portion centrale de l'ADN de λ , qui n'est pas essentielle à l'infection, est détruite, laissant des fragments 5' et 3' appelés bras (Figure 19). La région ayant subi la délétion peut être remplacée par l'ADN étranger pour produire un phage à ADN recombinant (Figure 19). Celui-ci est inséré dans les capsides phagiques *in vitro* par un processus appelé empaquetage qui suppose de mélanger l'ADN du phage recombinant avec un extrait d'empaquetage contenant les protéines de la capside du phage et des enzymes nécessaires à la fabrication. Des particules de phages recombinants sont produites et elles infectent *E.coli* avec une grande efficacité. Les cellules infectées sont étalées sur une plaque

d'agar et produisent un feuillet continu de bactéries appelé une couche qui contient de petites zones de la taille d'une épingle à cheveux. Ces zones correspondent aux plages de lyse produites par l'infection phagique. Des plages individuelles peuvent être isolées et utilisées pour générer des quantités importantes d'ADN cloné par infection de cultures fraîches d'E.coli (Winter et al., 2000 ;Tagu et Moussard ,2003).

Le principal avantage de λ en tant que vecteur de clonage est que la taille des fragments qui peuvent y être insérés est bien supérieure à celle des inserts plasmidiques. Le phage λ peut en effet héberger des fragments long jusqu'à 25Kpb, à comparer aux 10Kpbmaximales des inserts dans les vecteurs plasmidiques. Cette possibilité de cloner de plus larges fragments a conduit au développement de la principale utilisation de λ dans la construction de banques d'ADN.

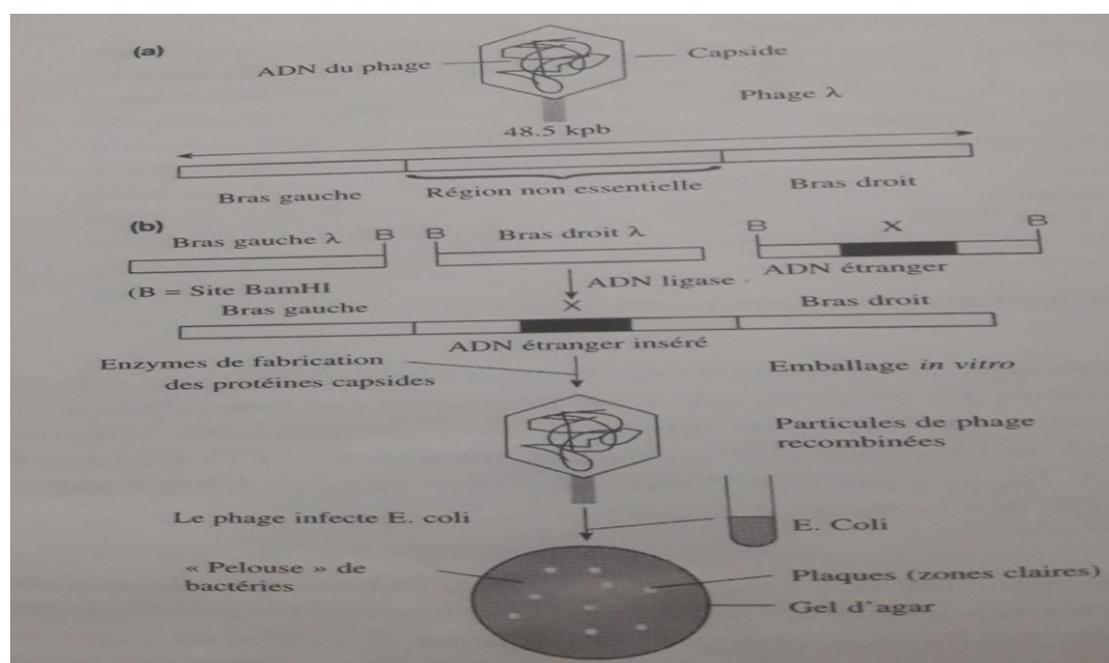


Figure 19 : (a) Le phage λ (b) Utilisation du phage λ comme vecteur de clonage (Winter et al., 2000) .

II.2.3. Cosmides :

Ce type de vecteur combine des caractéristiques rencontrées chez les plasmides et le phage λ . Les cosmides ont tous les traits normaux des plasmides, y compris un MCS et des gènes conférant une résistance à des antibiotiques, mais ils incluent aussi des séquences issues de λ Appelées séquences cos. Elles sont situées aux deux extrémités de la molécule d'ADN de λ et sont responsables de son insertion dans la capsid du

phage. Cloner avec des cosmides combine des caractéristiques associés à l'utilisation de λ et de plasmides comme vecteur de clonage (Figure 20). L'ADN des cosmides est clivé par une enzyme de restriction et lié à l'ADN étranger. Le cosmide recombinant est ensuite empaqueté dans les capsides de λ et utilisé pour infecter E.coli. Les cosmides ne contiennent pas tous les gènes de λ et ne forment donc pas de plages après infection. Au lieu de cela, les cellules infectées sont cultivées sur de l'agar contenant des antibiotiques et les colonies résistantes contenant des cosmides recombinants sont isolées et peuvent être amplifiées de la même façon que des plasmides. Les cosmides ont l'avantage d'être capable d'héberger de très gros inserts. Sachant que les cosmides sont petits, typiquement 8Kpb et que la capside de λ peut accueillir 52Kpb, les inserts cosmidiens peuvent mesurer jusqu'à 44Kpb (Winter et al., 2000; Tagu et Moussard, 2003).

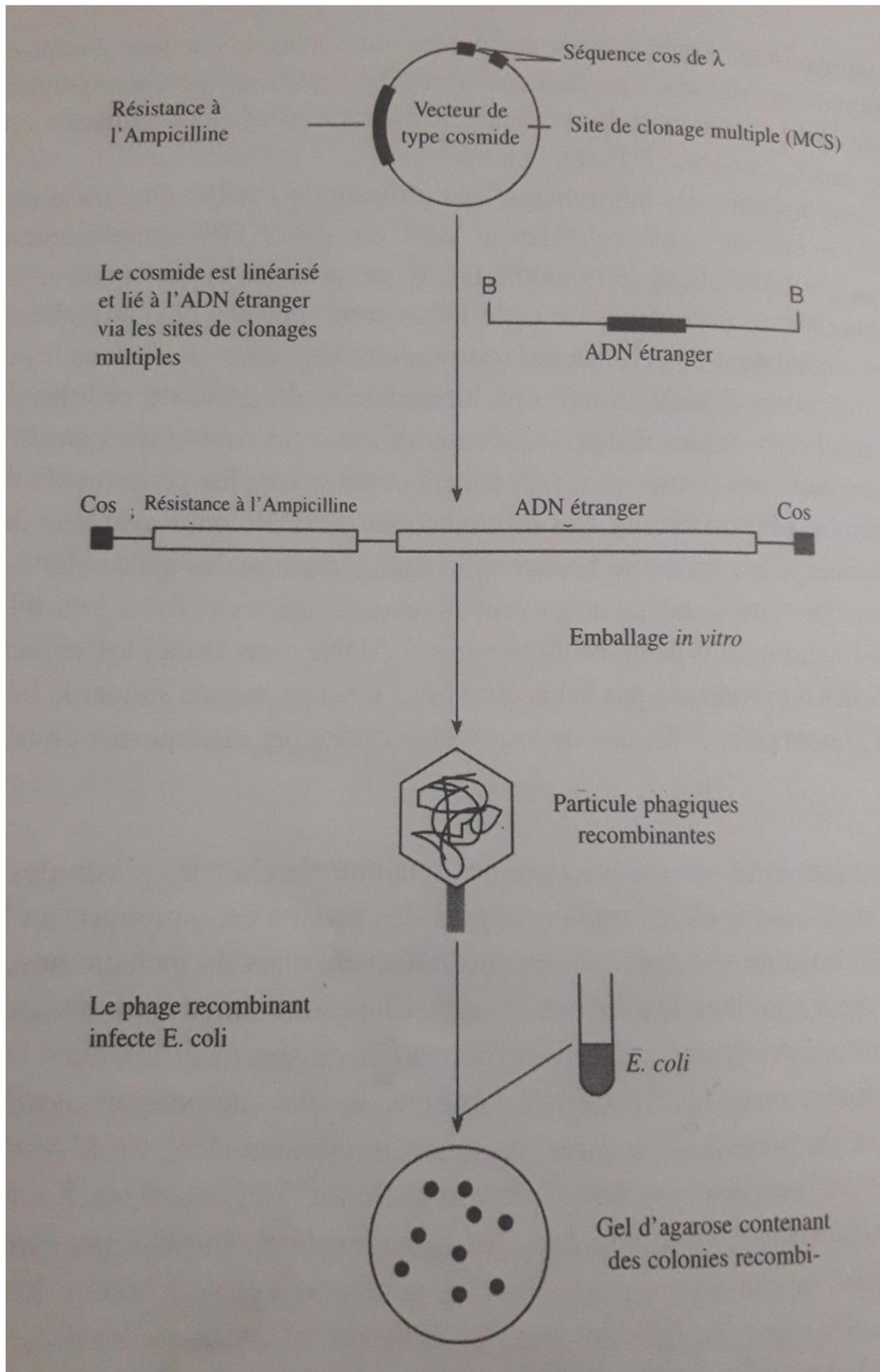


Figure 20 : Cloner avec des vecteurs cosmidiques (Winter et al., 2000).

III. Application du clonage de l'ADN :

Le clonage de l'ADN est une technique puissante qui a apporté d'importantes contributions dans de nombreux domaines de la recherche biologique, principalement :

- L'identification de gènes impliqués dans des maladies ;
- La cartographie des génomes ;
- La production de protéines recombinantes ;
- Les organismes génétiquement modifiés.