

## Chapitre 5 : Méthodologie et biologie Moléculaire

Il existe une série d'outils indispensables aux biologistes moléculaire pour analyser l'ADN, le cloner, l'amplifier, pour le transporter grâce à des vecteurs, l'intégrer dans des cellules hôtes ... Ces outils ont permis de mettre en place des techniques qui sont à l'origine du développement de la biologie moléculaire.

### 1- Extraction et purification de l'ADN

Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillon d'acides nucléiques.

L'analyse d'ADN, qu'elle serve à faire correspondre des échantillons prélevés sur une scène de crime à un suspect, à tester des maladies génétiques ou à identifier une nouvelle espèce animale ou végétale, requiert d'abord l'extraction de l'ADN d'un échantillon.

Les techniques d'extraction d'acides nucléiques sont relativement simples. Il convient simplement d'éviter toute destruction enzymatique ou mécanique. En effet les acides nucléiques qui sont stables dans la cellule intacte, deviennent très vulnérables à la digestion par les nucléases endogènes une fois la cellule lysée.

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 d'ADN recombinant. 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 de détection d'OGM en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Il existe une grande diversité de méthodes d'extraction et de purification des acides nucléiques, le choix de la technique la plus adéquate repose généralement sur les critères suivants :

- L'acide nucléique cible,
- L'organisme source,
- Le matériel de départ (tissu, feuille, graine, matériel transformé, etc.).
- Les résultats escomptés (rendement, pureté, temps de purification requis, etc.),
- L'application en aval (PCR, clonage, étiquetage, transfert d'ADN, RT-PCR, synthèse d'ADNc, etc.). Les principes de certaines des méthodologies les plus utilisées aujourd'hui pour extraire et purifier des acides nucléiques sont décrits dans les sections suivantes.

## 1.1. Méthodes d'extraction

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)
- et la digestion enzymatique (ex. protéinase K).

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



## 1.2. Méthodes de purification

Les méthodes de purification des acides nucléiques issus d'extraits cellulaires sont généralement des combinaisons de deux ou plusieurs des techniques suivantes :

- **Extraction/précipitation,**
- **Chromatographie,**
- **Centrifugation et séparation par affinité.**

### 1.2.1. Extraction/Précipitation

L'extraction par solvants est souvent utilisée pour éliminer les contaminants d'acides nucléiques,

- Une combinaison de phénol et de chloroforme sert fréquemment à supprimer les protéines.
- La précipitation par l'isopropanol ou l'éthanol est généralement utilisée pour concentrer les acides nucléiques. Si la quantité d'acides nucléiques cibles est faible, un véhicule inerte (tel que le glycogène) peut être ajouté au mélange afin d'accroître l'efficacité de la précipitation.
- D'autres méthodes de précipitation des acides nucléiques incluent la précipitation sélective à l'aide de fortes concentrations de sel («relargage») ou la précipitation de protéines en utilisant les changements au niveau du pH.

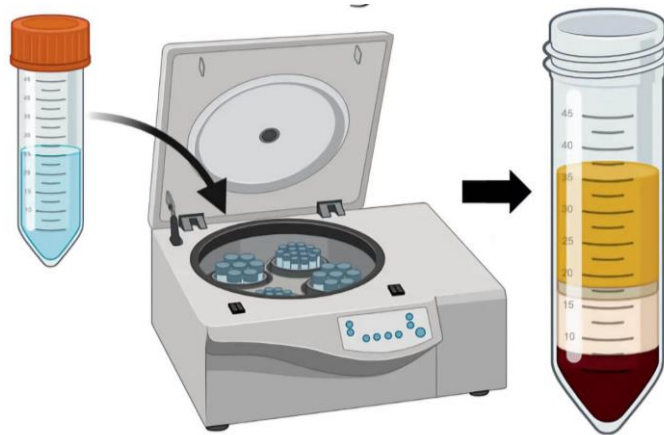
### 1.2.2. Chromatographie

Les méthodes chromatographiques peuvent utiliser différentes techniques de séparation, telles que la filtration sur gel, l'échange d'ions, l'adsorption sélective ou la liaison par affinité.

- **La filtration sur gel** exploite les propriétés du tamisage moléculaire de particules de gel poreuses. Une matrice avec des pores d'une taille définie permet aux petites molécules de traverser les pores par diffusion, tandis que les plus grosses molécules sont exclues et éluées. Les molécules sont donc éluées afin de diminuer la taille moléculaire.
- **La chromatographie par échange d'ions** est une autre technique qui à recours à l'interaction électrostatique entre une molécule cible et un groupe fonctionnel sur la matrice à colonne. Les acides nucléiques (polyanions linéaires à forte charge négative) peuvent être élués des colonnes d'échange d'ions grâce à de simples tampons de sel,
- **Dans la chromatographie par adsorption**, les acides nucléiques sont fixés sélectivement par adsorption sur des silices ou du verre en présence de certains sels (ex.: des sels chaotropiques), alors que d'autres molécules biologiques ne se fixent pas. Un tampon ou une eau faible en sels peut ensuite éluer les acides nucléiques et produire ainsi un échantillon à utiliser directement dans des applications en aval

### 1.2.3. La Centrifugation

La centrifugation sélective est une méthode de purification puissante. Elle consiste à séparer les composés d'une solution aux différentes densités en les exposants à une force centrifuge. Ce procédé de séparation des constituants d'un liquide permet d'isoler deux liquides, ou les particules solides d'un fluide.

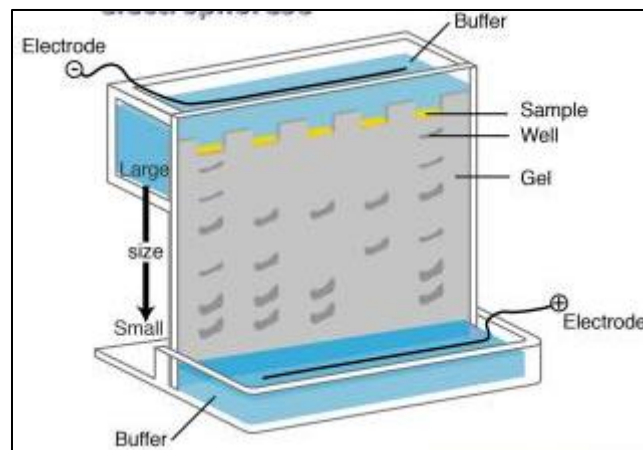


### 1.2.4. Séparation par affinité

- Ces dernières années, un nombre croissant de méthodes de purification ont combiné l'immobilisation par affinité d'acides nucléiques à la séparation magnétique. À titre d'exemple, des poly(A) + mARN peuvent être liés à des particules magnétiques revêtues de streptavidine par des oligo (dT) marqués à la biotine et le complexe de particules peut être extrait de la solution (et des contaminants non liés) à l'aide d'un aimant.
- Cette technique à phase solide simplifie la purification de l'acide nucléique, étant donné qu'elle peut remplacer plusieurs étapes de la centrifugation, de l'extraction organique et de la séparation de phase par une opération de séparation magnétique unique et rapide.

## 2. ELECTROPHORESE SUR GEL (SEPARATION DE FRAGMENT D'ADN)

L'électrophorèse est, avec la chromatographie, la principale des techniques utilisées en biologie pour la séparation et la caractérisation d'espèces. Dans un milieu donné, la séparation des espèces se fait en fonction de leur charge électrique et pour des charges identiques, en fonction de leur taille.



**Figure 1. L'électrophorèse**

L'ADN étant une molécule chargée négativement (au niveau des groupements phosphates), il est possible de la faire migrer sous l'effet d'un champ électrique vers le pôle positif. La migration se faisant de plus en plus dans un gel d'agarose ou de polyacrylamide, les grosses molécules seront plus freinées que les petites par le milieu d'électrophorèse. On observera donc une séparation des fragments d'ADN en fonction de leur masse : les petites molécules migreront le plus loin du dépôt, les plus grosses le plus près.

Deux principaux polymères sont utilisés : l'agarose et le polyacrylamide

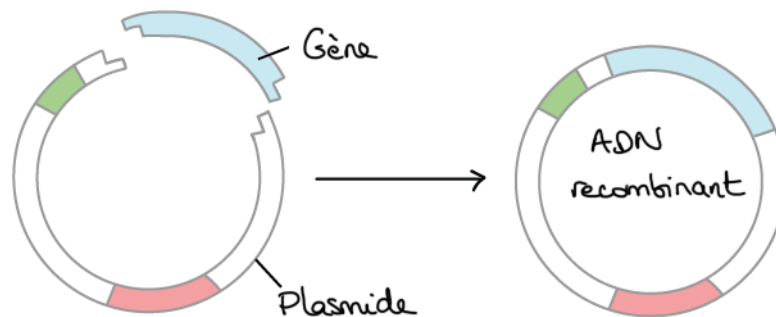
- **Le gel polyacrylamide** permet de séparer les petits fragments d'ADN inférieurs à quelques centaines de paires de bases, en position verticale.
- **Le gel d'agarose** permet de séparer les fragments de plusieurs milliers de paires de bases, en position horizontale.

On fait migrer en même temps que les fragments d'ADN des marqueurs de poids moléculaire, puis on révèle les fragments d'ADN par les UV, après les avoir mis en contact avec un agent **bromure d'éthidium** (marqueur d'acide nucléique, Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangé).

### 3. CLONAGE MOLECULAIRE

Le clonage consiste à obtenir des copies identiques et très nombreuses d'un même fragment d'ADN nécessite différents outils pour pouvoir être mené à bien :

- De l'ADN que l'on désire cloner
- Un ADN vecteur dans lequel on insère l'ADN ce qui donne de l'ADN recombiné
- Une cellule hôte qui va recevoir ce vecteur
- Un moyen de multiplier les cellules hôtes
- La sélection des cellules hôtes ayant réellement intégré le vecteur avec l'ADN recombiné
- L'isolement et la purification de l'ADN recombiné multiplié



**Figure 2.** Principe du clonage moléculaire

#### 3.1. L'ADN recombiné

Il s'agit d'un hybride d'ADN provenant de deux espèces différentes, l'un des fragments d'ADN (celui que l'on désire cloner, l'insert) étant inséré dans un autre (vecteur). Cette production se fait *in vitro*, alors que la réplication se fera *in vivo*.

Ce sont les enzymes de restriction qui vont permettre l'insertion. Elles vont cliver le vecteur et l'ADN insert. Une ligase permettra ensuite de lier les deux ADN, ce qui produira au final l'ADN recombiné.

#### 3.2. Les vecteurs

Ce sont de petits ADN dans lesquels l'ADN à cloner est inséré, et qui une fois incorporés dans une cellule hôte, seront capables de s'y répliquer en grande quantité.

### 3.3. La cellule hôte

La cellule hôte ne doit évidemment pas modifier ou détruire l'ADN recombiné qui a été introduit. Comme la plupart des bactéries possèdent des enzymes de restriction pour leur propre défense naturelle, il faut utiliser des souches mutantes dépourvues de ces enzymes.

- **Introduction du vecteur dans la cellule hôte**

Pour cette étape de transformation, on met une suspension de bactéries en présence du vecteur recombinant. Ces bactéries sont rendu compétentes, c'est-à-dire capables d'accepter le vecteur recombinant, par un traitement chimique qui perméabilise leur membrane.

- **Culture *in vitro* des cellules hôtes**

Dans le cas des bactéries, sachant qu'une division prend en moyenne 20 minutes, on obtient rapidement une grande quantité d'ADN cloné.

### 4. METHODE PCR

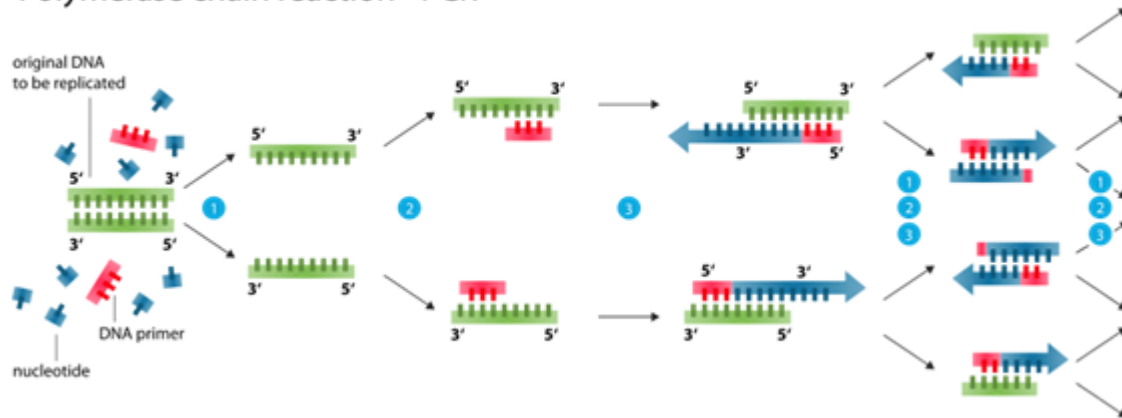
Cette technique (*Polymerase Chain Reaction*) permet d'amplifier une quantité d'ADN de manière très importante et beaucoup moins lourde qu'avec le clonage traditionnel, puisque l'ensemble de l'opération se fait *in vitro*.

L'inconvénient est que l'on amplifie que de petits fragments d'ADN de quelque milliers de bases, et que l'on obtient des quantités d'ADN bien inférieures à celles obtenues par le clonage cellulaire.

La technique se fait par une succession de cycles comportant les étapes suivantes :

- Dénaturation de l'ADN à la chaleur (95°C) pour séparer les deux brins
- Hybridation de chaque brin avec une amorce spécifique (50 à 60°C)
- Extension de ces amorces grâce à une ADN polymérase (70°C)

### Polymerase chain reaction - PCR



**Figure 3.**Principe de la PCR

**(1) Dénaturation de l'ADN à 90-95°C ; Séparation des deux brins**

**(2) Mise en place des amorces 50 à 60°C**

**(3) Début de la polymérisation par la Taq polymérase (à 70°C)**

La technique gagnée en rapidité quand on a pu travailler avec une ADN polymérase non inhibée par la chaleur, ce que l'on sait faire depuis 1988, avec la Taq polymérase (isolée d'une bactérie vivant dans les sources d'eau chaude, *Thermus aquaticus*).

Les appareils de PCR ne sont donc que des incubateurs. Il suffit de placer dans un tube l'ensemble des matières premières nécessaires à la PCR, à savoir des Taq polymérases, un fragment d'ADN à amplifier, des désoxyribonucléotides et des amorces encadrant la séquence à amplifier.

#### **4.1. Applications de la PCR**

La PCR est notamment utile quand on dispose de matériel génétique en faible quantité ou en mauvais état. Elle trouve de nombreuses applications dans :

- le clonage et le séquençage génétique
- le diagnostic de maladies génétiques
- la détection de mutations
- le dosage protéique
- la détection des OGM
- l'identification d'individus (science médico-légale)
- la détermination de filiation
- la mutagenèse dirigée (à l'aide d'amorces mutées)
- le marquage de l'ADN (notamment pour la recherche fondamentale)
- l'étude des fossiles.



## 5. Séquençage d'ADN

Le **séquençage de l'ADN** constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci.

Plusieurs techniques de séquençage d'ADN existent, mais nous ne décrivons ici que le principe d'un séquençage enzymatique par incorporation de **didésoxynucléotides**. Les **didésoxynucleotides (ddNTPs)** sont des **désoxynucléotides modifiés**, capables de s'intégrer dans une chaîne d'ADN en synthèse, mais empêchant l'incorporation du nucléotide suivant.

### 5.1. Les différents acteurs du séquençage

- **L'ADN provient des organismes** dont on souhaite séquençer le génome. L'ADN, le plus souvent sous la forme double-brin, est dénaturé afin de séparer les deux brins. Celui qui sera séquençé s'appelle le brin « matrice » ;
- **Les nucléotides**, ou plutôt désoxynucléotides, sont les briques de l'ADN (A, C, G ou T). Ils sont attachés les uns aux autres grâce à des liaisons chimiques nécessitant la présence d'un groupement OH particulier (sur le carbone 3' du ribose) ;
- **Les didésoxynucléotides** sont des nucléotides privés du groupement OH en position 3'. Leur incorporation dans une chaîne d'ADN interrompt définitivement la synthèse de l'ADN ;
- **Une amorce est un brin d'ADN** très court (une vingtaine de nucléotide), qui peut s'hybrider à une séquence complémentaire spécifique ;
- **L'ADN polymérase** est une enzyme qui a pour rôle de copier l'ADN, en synthétisant un brin complémentaire au brin matrice. L'ADN polymérase ne fonctionne qu'en ajoutant des nucléotides à une amorce déjà présente, en fonction de la succession de nucléotides du brin matrice (un A est toujours positionné en face d'un T et un C toujours en face d'un G).

---

## 5.2. Les étapes du séquençage

**1** - Pour le séquençage, tout se passe initialement dans un tube à essai, en présence des acteurs de la synthèse de l'ADN : de l'ADN à séquencer, des nucléotides, une amorce et de l'ADN polymérase. Chacun de ces acteurs est présent en grande quantité. La réaction de séquençage fait donc intervenir de multiples réactions.

**2** - L'ADN polymérase utilise aléatoirement les nucléotides présents dans le milieu pour copier le brin (ou fragment, ou chaîne) matrice en synthétisant un ADN de séquence complémentaire, du moment que la base (A, C, G ou T) est respectée.

**3** - Lorsque l'ADN polymérase choisit par hasard un didésoxynucléotide (ce qui est rare puisqu'il y en a moins que des nucléotides) et qu'elle l'incorpore dans la chaîne en synthèse, celle-ci s'interrompt prématurément. Puisque chaque didésoxynucléotide est marqué par un fluorochrome différent (A vert, T rouge, G jaune et C bleu), une chaîne qui se termine par exemple par un A sera verte.

**4** - Puisqu'un grand nombre de réactions de synthèse ont lieu dans le tube, il existe statistiquement des chaînes de toutes les tailles (correspondant à un arrêt de la synthèse à chaque nucléotide) et beaucoup de fragments d'une même taille. Ces chaînes commencent toutes au même endroit sur l'ADN matrice (déterminé par l'amorce utilisée), toutes celles qui possèdent la même longueur se terminent donc par le même didésoxynucléotide marqué.

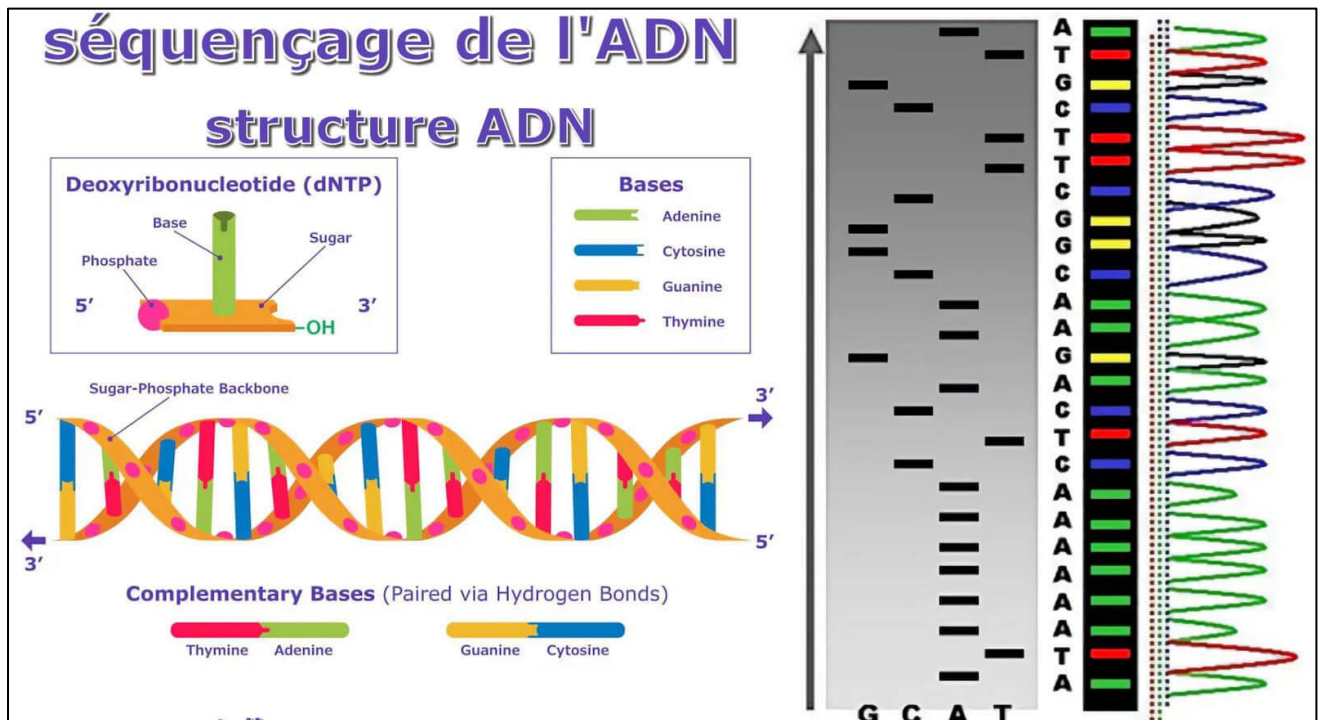
**5** - Il est alors possible de séparer les chaînes d'ADN obtenues en fonction de leur taille, sur un gel d'acrylamide en présence d'un courant électrique. Plus les chaînes sont courtes, plus elles migrent loin et tous les fragments d'une même taille migrent à la même distance.

On obtient alors une succession de bandes colorées, chacune correspondant au dernier nucléotide incorporé. Il suffit alors de lire la succession des couleurs pour connaître l'ordre des nucléotides, c'est-à-dire la séquence de l'ADN, étape assurée automatiquement par les détecteurs du séquenceur

## 5.3. Séquençage automatique

Lors de ces analyses, la lecture du gel et l'acquisition des données sont automatiques. Dans ce cas, le marquage des molécules se fait à l'aide de marqueurs fluorescents. Lors de la migration sur gel, les échantillons sont détectés à leur sortie par un laser qui identifie la molécule marquée.

De nouveaux systèmes fondés sur l'électrophorèse capillaire permettent une meilleure automatisation du système : les échantillons sont préparés manuellement puis déposés sur un chargeur automatique. L'appareil prélève automatiquement l'échantillon et le place sur le capillaire. Il n'est plus nécessaire de préparer des gels d'acrylamide. Les séquenceurs automatiques peuvent analyser en quelques heures jusqu'à 96 échantillons.



## 6. Les enzymes utilisées pour l'étude des acides nucléiques

### 6.1. Les nucléases

Les enzymes qui hydrolysent les liaisons phosphodiester d'un acide nucléique (selon la réaction représentée) sont appelées nucléases. Les exonucléases hydrolysent les liaisons phosphoesters aux extrémités 5' ou 3' de la chaîne, alors que les endonucléases hydrolysent des liaisons phosphoester à distance des extrémités.

Ces enzymes peuvent être de deux types : des endonucléases, qui créent des coupures à l'intérieur même des chaînes d'ADN ou d'ARN et créent de cette façon deux brins distincts ; des exonucléases, qui détachent les nucléotides situés aux extrémités des chaînes d'ADN ou d'ARN.

### Les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des enzymes de type endonucléase qui réalise des coupures de l'ADN double brin, en des sites spécifiques, déterminés par une courte séquence de quatre à huit paires de nucléotides. La réaction se produit en présence de  $MgCl_2$  (10 mmol/L), l'ion  $Mg^{2+}$  étant un cofacteur et est, en général, irréversible.

Les enzymes de restriction sont issus de bactéries. Leur rôle est de couper l'ADN étranger des virus qui infectent les bactéries, les bactériophages. Ainsi, les enzymes de restriction empêchent les virus de se multiplier et permettent aux bactéries de survivre.

Les séquences cibles existeront donc par le seul fait du hasard dans n'importe quelle séquence d'ADN longue. On peut ainsi estimer qu'un site de 6 bp se rencontrera environ toutes les 46 (soit 4 096) bp, ce qui générera des fragments ayant en moyenne 4,1 kb (kilo paires de base).

### 7. Restriction et analyses des polymorphismes RFLP

C'est en 1980 que **Botstein et coll.** ont publié une carte génétique du génome humain qui, pour la première fois, utilisait des marqueurs génétiques issus de **la technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction** (de l'anglais **Restriction Fragment Length Polymorphism, ou RFLP**).

Le polymorphisme existant entre individus d'une même espèce peut être ainsi visualisé grâce au polymorphisme de leur ADN. Cette technique permet de mettre en évidence les "particularités" d'un individu.

**La technique de base pour la détection des RFLP** consiste à fragmenter un échantillon d'ADN à l'aide d'une enzyme de restriction, qui peut cliver sélectivement une molécule d'ADN chaque fois qu'une séquence courte et spécifique est reconnue dans le cadre d'un processus connu sous le nom de « digestion de restriction ».

Cette technique a eu immédiatement un gros succès auprès des généticiens, car elle donnait accès à un nombre très élevé de marqueurs distribués le long du génome. Ni les isozymes, ni même les protéines totales révélées en électrophorèse bidimensionnelle, n'offraient cette possibilité.

#### 7.1. Les étapes de la technique de RFLP

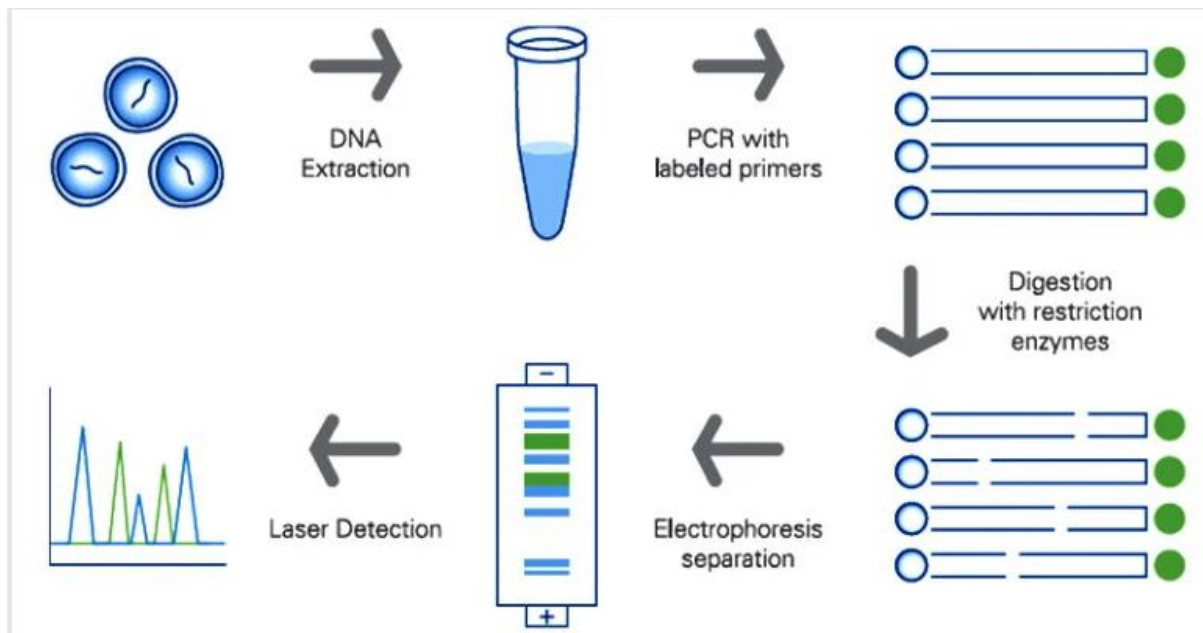
- **Extraction** de l'ADN des différents génotypes à analyser

- **Digestion** de l'ADN par un enzyme de restriction. C'est l'extrême spécificité de ces enzymes qui est exploitée pour la mise en évidence du polymorphisme : une présence-absence de site de restriction entraîne un polymorphisme de longueur de fragments.

Ce phénomène n'étant pas rare, la digestion de l'ADN de deux individus quelconques dans une espèce donnée produit de très nombreuses différences de longueur des fragments. S'il est aisé d'obtenir des fragments polymorphes, leur visualisation est délicate. C'est ce que permettent les étapes suivantes.

- **Les fragments de restriction sont séparés** selon leur taille par une électrophorèse en gel d'agarose. L'ADN étant chargé négativement, il migre de la cathode vers l'anode. Les fragments les plus petits sont les plus rapides.
- **L'ADN est transféré** sous forme dénaturée sur une membrane de nylon. La position relative des fragments d'ADN est préservée durant le transfert.
- **La membrane est incubée dans une solution** contenant une sonde marquée préalablement, soit par la radioactivité, soit chimiquement. La sonde s'hybride alors avec le ou les fragments d'ADN avec lesquels elle présente une homologie.

On utilise couramment deux sources de sondes, **les sondes génomiques (ADNg) et les sondes d'ADN complémentaire (ADNc)**.



**Les sondes génomiques** sont obtenues par digestion de l'ADN total du génome nucléaire de l'espèce étudiée à l'aide d'un enzyme de restriction. Pour pallier partiellement les problèmes posés par les ADN répétés, on a couramment recours à des enzymes de restriction sensibles à la méthylation, comme Pst 1, qui vont générer de très grands fragments dans les régions répétées méthylées, fragments qui ne seront pas clonables ou amplifiables. Les sondes d'ADNc correspondent nécessairement à des gènes exprimés, puisqu'elles sont obtenues à partir des ARN messagers.

- **L'endroit, ou les endroits**, où la sonde s'est fixée sont révélés en plaçant la membrane au contact d'un film sensible à la radioactivité (figure), ou en réalisant une réaction enzymatique colorée spécifique. Les étapes 4 à 6 correspondent à la technique de Southern.

### **Les applications de la technique de RFLP**

- Enumérer les applications de la technique de RFLP revient à énumérer les utilisations des marqueurs génétiques, que l'on peut diviser en deux grandes catégories :
- les études de diversité, avec les analyses de structuration intra ou interpopulation, le criblage de variants dans les populations, l'identification variétale, etc.
- la construction de cartes de liaisons génétiques, avec leurs multiples intérêts : localisation de gènes majeurs, analyse de la recombinaison, cartographie de gènes à effets quantitatifs, etc. la construction de cartes est ainsi très répandue chez les végétaux. Depuis 1986, date de la première publication de cartes RFLP chez le maïs et la tomate (Helentjaris et al.1986), des cartes génétiques partielles ou complètes ont été publiées pour 34 espèces de plantes.

D'autres méthodes de marquage, fondées sur **la PCR**, sont maintenant en train de supplanter la RFLP pour diverses applications, mais celle-ci reste encore très utilisée lorsque l'on recherche des marqueurs codominants et spécifiques de locus.

Elle reste la technique de choix pour les travaux de cartographie comparée, qui se sont beaucoup développés ces dernières années. Enfin dans le domaine de l'évolution moléculaire, elle permet la comparaison de cartes de restriction pour des locus particuliers, dans le but d'établir des phylogénies de gènes.