

Cour 01 : ADN : propriétés, extraction, purification et quantification

La **biologie moléculaire** (parfois abrégée bio. mol.) est une discipline scientifique de la vie au croisement de la génétique, de la biochimie métabolique et de la physique, dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire.

Les biologistes moléculaires ont appris à caractériser, isoler et manipuler les composants moléculaires des cellules et des organismes. Ces composants incluent l'ADN, support de l'information génétique, l'ARN, proche de l'ADN dont les fonctions vont de la copie provisoire d'ADN jusqu'aux réelles fonctions structurelles et enzymatiques et qui est une partie fonctionnelle et structurelle de l'appareil traductionnel, et les protéines, molécules structurelles et enzymatiques les plus importantes des cellules.

- Quelle est l'importance des techniques de biologie moléculaire ?

Plus généralement, les techniques de biologie moléculaire sont utiles aux laboratoires de biologie pour **accélérer quantitativement et qualitativement le traitement des prélèvements qui leur sont confiés.**

- Comment comprendre la biologie moléculaire ?

La **biologie moléculaire** explore la structure et la fonction des macromolécules biologiques, en explorant la structure, la biosynthèse et la fonction de l'ADN et de l'ARN au niveau **moléculaire**, et en explorant la manière dont elles interagissent les unes avec les autres et avec les protéines.

- Quels sont les objectifs de la modélisation moléculaire ?

La modélisation moléculaire consiste à construire des modèles des molécules ou d'ensemble de molécules, dans le but de **mieux en comprendre la structure et les autres propriétés physico-chimiques.**

- Quel est le rôle de la biologie moléculaire ?

La biologie moléculaire **analyse, dans les molécules, la structure du génome et ses altérations (mutations) ainsi que les mécanismes de l'expression, normale et pathologique, des gènes.** L'expression biologie moléculaire est parfois employée pour désigner les techniques d'étude des gènes.

1. Les propriétés de l'ADN

L'ADN = l'acide désoxyribonucléique est une macromolécule, constituant essentiel des chromosomes et porteur de caractères génétiques. il est contenu dans les chromosomes du noyau cellulaire et dans les mitochondries.

ADN = porteur de l'information génétique

- Quelles sont les propriétés de la molécule d'ADN ?

L'ADN est capable de se répliquer, c'est à dire de se recopier fidèlement. L'ADN se scinde en deux brins, chaque brin séparé servant de modèle pour fabriquer un brin complémentaire. Résultat : deux nouvelles molécules d'ADN, chacune avec un ancien et un nouveau brin.

- Quelles sont les trois grandes fonctions de l'ADN ?

L'ADN sert trois fonctions principales : **la formation de protéines et de l'ARN, l'échange de matériel génétique lors de la division cellulaire pendant la méiose et la facilitation de mutations génétiques au sein d'une population.**

- Quelles sont les 4 bases de l'ADN ?

Cette molécule est une double hélice caractérisée par l'alternance de bases azotées **purine (adénine, guanine) ou pyrimidine (cytosine, thymine)**. Les bases de chaque brin d'ADN sont localisées vers le centre de l'hélice et celles-ci se lient entre elles, rassemblant ainsi les deux brins d'ADN

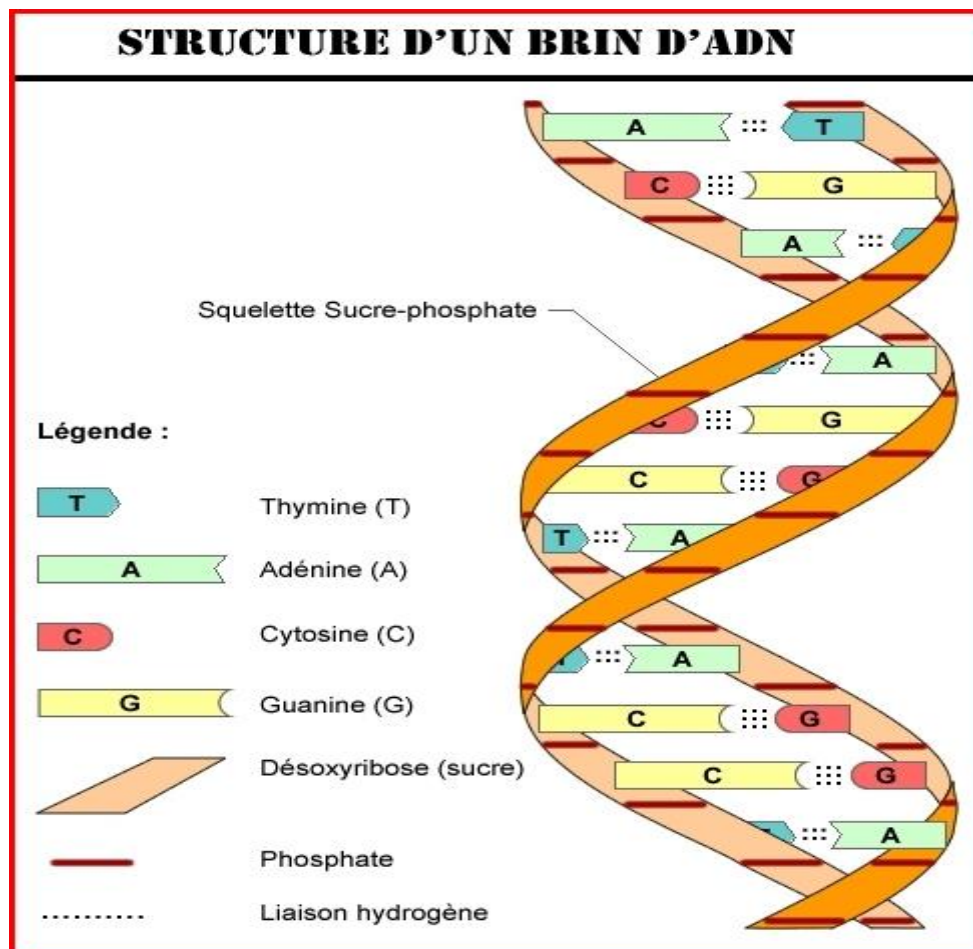


Figure : la structure de l'ADN

- Quels sont les 3 composants d'un nucléotide ?

Les **nucléotides** constituent les éléments de base des acides nucléiques, l'ADN et l'ARN. Ils **sont** composés de trois éléments principaux : une base azotée, liée à une molécule de sucre et à un groupement phosphate.

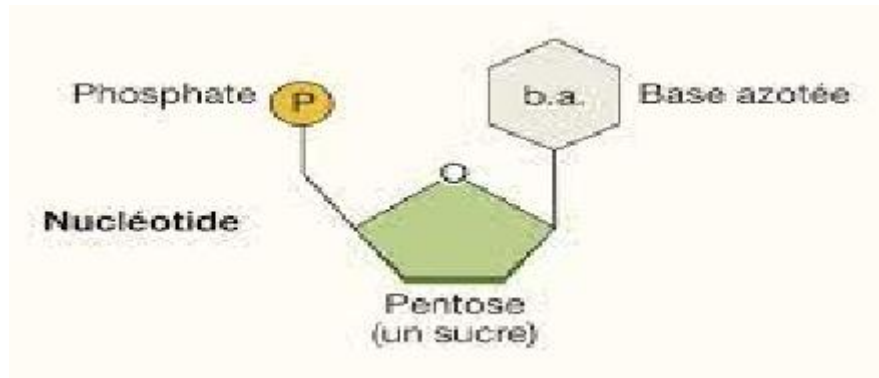


Figure : les composants d'un nucléotide

Une molécule d'ADN à l'état naturel, c'est-à-dire à l'intérieur d'une cellule vivante, est formée de deux chaînes polynucléotidiques, appariées et enroulées en une spirale, pour former une double hélice.

- Quel est le rôle de l'ADN chez les êtres vivants ?

C'est la molécule support du patrimoine génétique de tout être vivant. La longue chaîne d'ADN est composée d'une succession de nucléotides (contenant des bases) accrochés les uns aux autres par des liaisons phosphodiester.

2. La réplication d'ADN (duplication de l'ADN ou synthèse de l'ADN)

Lorsqu'une cellule se reproduit (mitose ou méiose), elle doit produire deux copies de son ADN. C'est ce qu'on appelle la réplication de l'ADN. Cette étape a lieu juste avant la division cellulaire.

Pendant le processus de réplication, qui consiste en la formation de copies de la molécule d'ADN, la double hélice s'ouvre, les deux chaînes se séparant et servant chacune de matrice pour la création d'une nouvelle chaîne selon les règles de la complémentarité. Le résultat final est la formation de deux doubles hélices, chacune contenant l'un des deux brins originaux (brin « parental ») et un nouveau brin (brin « néosynthétisé »). Cette réplication est dite semi-conservative (parce qu'elle conserve l'un des deux brins originaux dans chaque nouvelle copie d'ADN). Elle fut décrite sur des bases exclusivement théoriques comme le mode de réplication le plus adapté étant donné la structure de l'ADN.

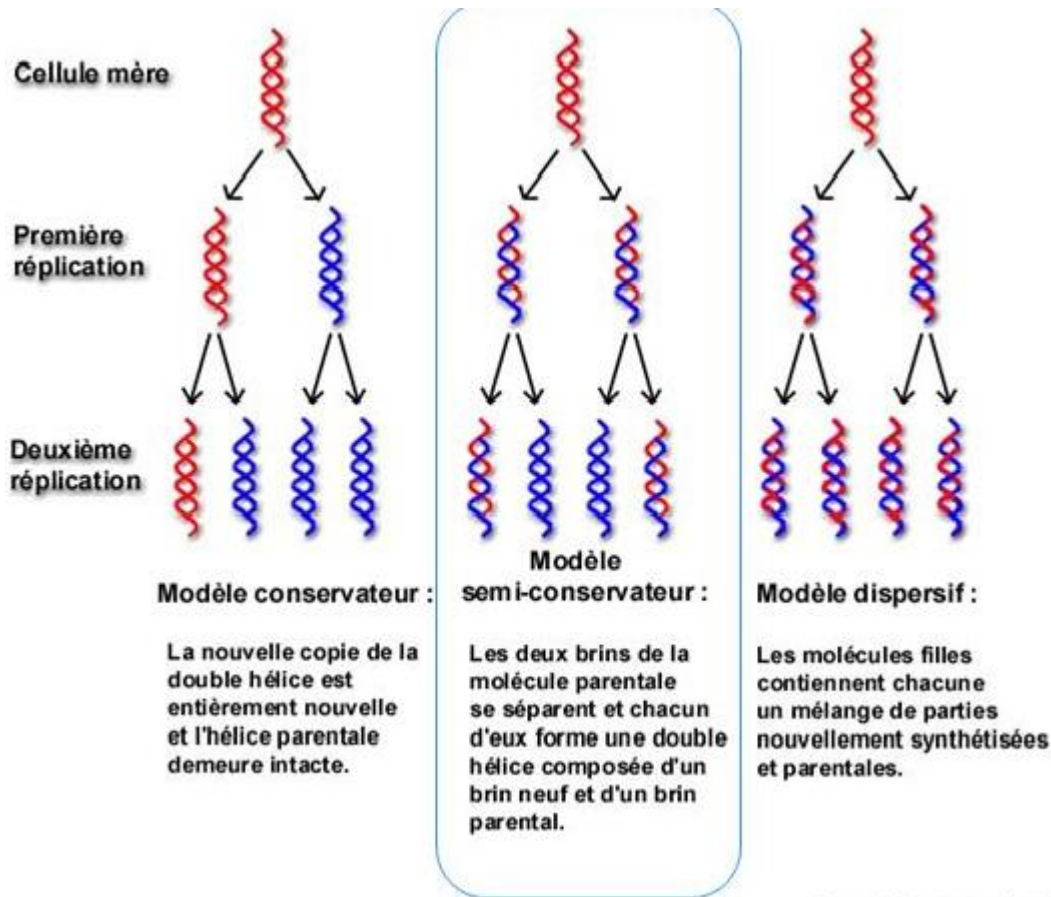


Figure : les modelés de répllication

L'unité d'ADN où se produit la répllication est appelée le réplicon. Ce réplicon a une origine où est initiée la répllication et une terminaison où est arrêtée la répllication.

La répllication peut être divisée en trois étapes principales : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

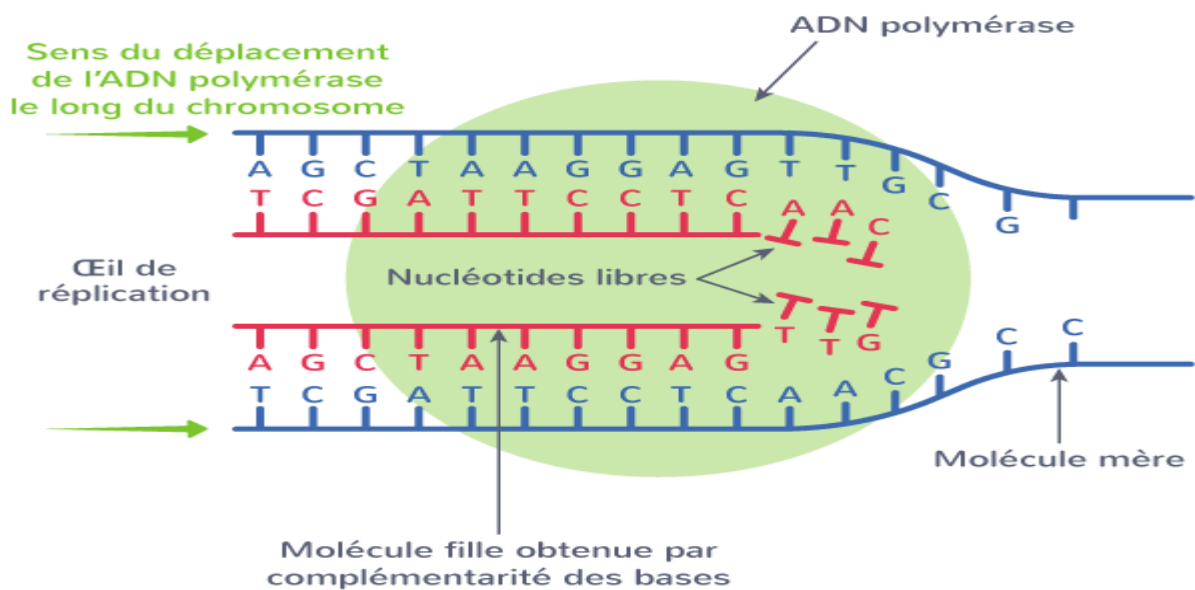


Figure : La répllication d'ADN

- Les éléments nécessaires à la réplication

Une matrice d'ADN qui correspond à un brin parental et qui sert de modèle.

Une amorce ayant une extrémité 3'-OH libre.

Des enzymes spécifiques : ADN polymérase.

Les quatre désoxyribonucléotides 5'-triphosphate (dATP, dTTP, dCTP et dGTP).

Des ions magnésium (Mg^{+2}) qui stabilisent l'ADN.

3. L'extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN des cellules ou des tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire telles que le séquençage, la PCR ou le clonage.

Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- La collecte et le stockage de tissus
- la lyse des cellules
- Élimination des protéines et la solubilisation des lipides avec des détergents
- La séparation de l'ADN des autres molécules et élimination des autres acides nucléiques (ARN).
- La purification de l'ADN séparé
- La suspension dans un tampon approprié

L'une des méthodes les plus utilisées chez les végétaux est dite la méthode **CTAB** (par rapport au composant principal du tampon de lyse qui est le bromure de cetyl-triméthyl-ammonium (Cetyl-Trimethyl-Ammonium Bromide). Le CTAB solubilise les membranes et les complexes avec l'ADN.

Cette méthode a été décrite en 1980, et elle reste populaire du fait que tous les composants peuvent être préparés au laboratoire et donc le coût par échantillon reste faible.

Il existe aussi la méthode SDS dont le tampon de lyse est dodécylsulfate de sodium (**Sodium Dodecyl Sulfate**).

Au cours des dernières décennies, des kits commerciaux pour l'extraction rapide à partir de matériel végétal sont devenus d'une utilisation routinière.

Les kits commerciaux se sont révélés être très fiables dans la production de rendements élevés de l'ADN hautement purifié, et ainsi sont devenus la norme lors de la réalisation des dosages moléculaires sensibles. Ces kits restent trop chers par rapport aux méthodes anciennes.

4. La purification et la quantification de l'ADN

- Pourquoi purifier de l'ADN ?

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont essentielles pour un grand nombre d'études en biologie moléculaire. Le rendement et la pureté des acides nucléiques sont deux éléments importants pour **assurer l'efficacité et la fiabilité des analyses**.

- Pourquoi quantifier l'ADN ?

La **quantification** de l'**ADN** est une méthode pré-analytique importante, qui revêt une grande importance pour de nombreuses méthodes d'analyse de biologie moléculaire et peut même déterminer leur succès.

Le rendement et la pureté des acides nucléiques sont deux éléments importants pour **assurer l'efficacité et la fiabilité des analyses**.

Le dosage peut se faire par plusieurs méthodes tels que : le spectrophotomètre, l'électrophorèse sur gel d'agarose et la PCR.

- Le dosage de l'ADN par spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus la substance est concentrée plus elle absorbe la lumière.

Le dosage s'effectue dans l'ultra-violet à 260 nm. Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260 nm. Une unité de densité optique correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50 µg/ml ou à l'absorption d'une solution d'ADN simple brin (ou d'ARN) à la concentration de 25 µg/ml.

- Comment confirmer la pureté de l'ADN extrait ?

La pureté de l'ADN extrait est déterminée en calculant le rapport $R = DO\ 260\ \text{nm} / DO\ 280\ \text{nm}$.

Si :

- $1,6 < R < 2$: l'ADN est pur.
- $R < 1,6$: l'ADN est contaminé par les protéines,
- $R > 2$: l'AND est contaminé par des ARN.

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, on n'aboutira pas à des résultats fiables dans les étapes suivantes de son analyse