

# § Principaux outils de la biologie moléculaire

## 1- Principaux outils de la biologie moléculaire

La biologie moléculaire consiste à étudier la structure des gènes, leur expression et le contrôle de leur expression. Elle conduit donc à travailler essentiellement avec des molécules d'ADN, et d'ARNm.

### 1-1- Quelques définitions

#### 1-1-1- L'ADN recombinant (ou recombiné)

On appelle « ADN recombinant » un ADN hybride obtenu *in vitro* par combinaison de deux molécules d'ADN appartenant à deux espèces différentes. Par exemple un fragment d'ADN humain à étudier, dit ADN d'intérêt, est greffé sur un ADN viral.

On appelle « vecteur » l'ADN dans lequel on insère l'ADN à étudier et qui sert en fait de support. L'ADN inséré est appelé « insert » ou « ADN exogène » ou « ADN étranger ».

L'ADN recombinant est préparé dans le but d'effectuer « un clonage », ce clonage peut être ou non accompagné d'une expression de protéines.

#### 1-1-2- Clonage de l'ADN recombinant

Un « clone » est, par définition, un grand nombre de cellules, ou de molécules identiques, provenant d'un seul ancêtre, que cet ancêtre soit une cellule ou une molécule.

L'ADN recombinant a le grand avantage de pouvoir se répliquer dans une bactérie comme l'aurait fait le bactériophage. C'est donc un moyen commode de produire une amplification du fragment d'ADN à étudier. Une amplification d'ADN peut aussi être obtenue par voie enzymatique *in vitro*, avec la technique de **polymerase chain reaction** ou **PCR**.

#### 1-1-3- Expression d'ADN recombinant

L'expression de la séquence d'ADN insert nécessite la présence de signaux de transcription en amont de cette séquence placés donc en général dans le vecteur. Ces signaux peuvent être spécifiques des machineries transcriptionnelles de bactéries, levures ou encore de cellules de mammifères, selon la cellule hôte choisie pour cette expression.

#### 1-1-4- Les banques d'ADNc et génomiques

##### ➤ Banques d'ADNc

Rappelons tout d'abord qu'un ADNc est une copie d'ADN double brin d'un ARNm, et ne possède donc pas d'introns. Une banque d'ADNc est

une collection d'ADNc recombinants. Ainsi si on s'intéresse à une protéine X exprimée dans un tissu donné, on purifiera l'ARNm de ce tissu, et on fabriquera les ADNc correspondant à ces ARNm que l'on clonera dans un vecteur. Cette banque d'ADNc ainsi constituée représentera des séquences codant pour les protéines de ce tissu. Cette information génétique se limitera donc aux gènes exprimés dans le tissu et aux séquences codant les protéines (pas d'introns).

➤ **Banques génomiques**

Une banque génomique s'oppose à une banque d'utiliser une banque génomique d'ADNc par le fait qu'elle représente la totalité du génome. Une telle banque est en effet obtenue par fragmentation d'ADN génomique. Elle est constituée de toute une collection d'ADN recombinants correspondant aussi bien à des séquences codantes qu'à des séquences non codantes. Chaque partie du génome y est théoriquement représentée au moins une fois. Pour connaître la structure d'un gène, il faut évidemment utiliser une banque génomique et non une banque d'ADNc. Il en est de même lorsqu'on s'intéresse à des régions d'ADN non transcrites. D'autre part, quand on ne sait pas dans quelle cellule est synthétisée la protéine étudiée, un moyen infaillible de trouver son gène est d'utiliser une banque génomique. Mais il est plus difficile de travailler avec une banque génomique dont la taille est bien plus élevée que celle d'une banque d'ADNc. Elle contient en effet environ cent fois plus d'information de séquences d'ADN qu'une banque d'ADNc.

**1-2- Les principaux outils de la biologie moléculaire**

**1-2-1- Les enzymes**

➤ **Les enzymes qui coupent l'ADN**

Les enzymes de restriction sont des enzymes qui vont modifier l'ADN au niveau de séquences spécifiques donc ils sont capables de couper des molécules d'ADN double brin en des sites très spécifiques de chaque enzyme et reconnus par lui.

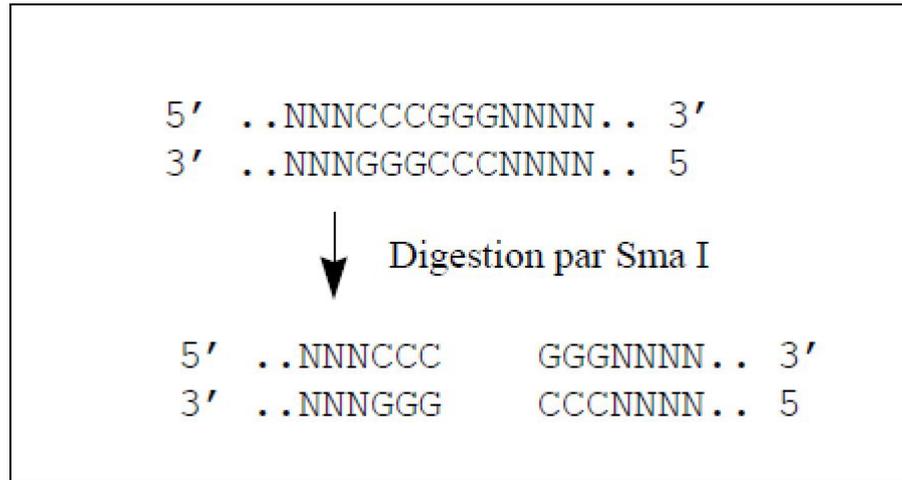
Ces enzymes sont classés en fonction de leur site de reconnaissance et leur lieu de coupure.

Les séquences de nucléotides habituellement reconnues par les enzymes de restriction sont nommées « palindrome ».

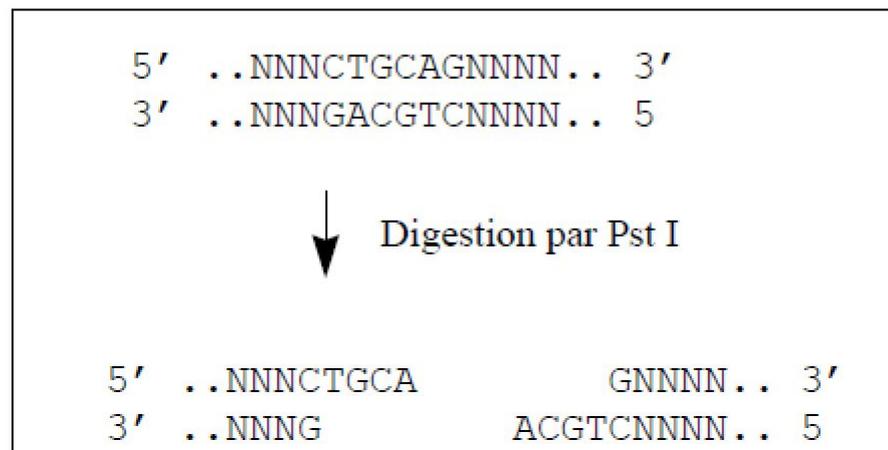
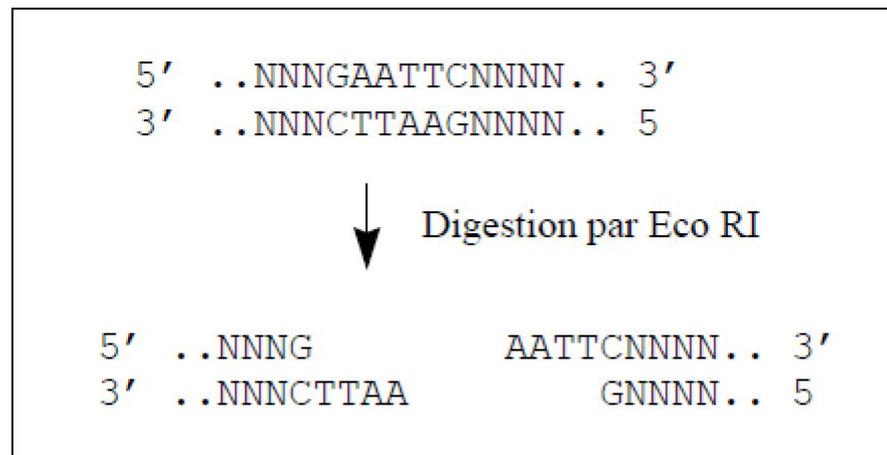
Les enzymes de restriction sont isolés de micro-organismes, bactéries le plus souvent. On donne à ces enzymes des noms à trois ou quatre lettres qui rappellent l'origine du micro-organisme d'où ils ont été isolés. Par exemple et à titre indicatif EcoR1 est isolé de *E.coli*, HpaI de *Haemophilus parainfluenzae* (R signifie une endonucléase, le chiffre romain est utilisé lorsque plusieurs enzymes ont été isolés à partir d'une même souche).

On observe deux types de coupures par les enzymes de restriction :

-coupure donnant des « extrémités franches » : la coupure d'une molécule d'ADN peut se faire au milieu du palindrome ;



-coupure donnant des « extrémités adhésives » (ou « bouts collants ») ; d'autres types d'enzymes agissent en coupant de part et d'autre du centre de symétrie.



Un enzyme de restriction est donc capable de repérer sur toute la longueur d'un ADN certaines séquences caractéristiques. Si cette séquence se trouve cinq fois dans une molécule d'ADN, l'enzyme coupera cet ADN en ces cinq endroits, ce qui donnera cinq fragments d'ADN. Donc selon l'enzyme utilisé, un même ADN sera coupé différemment.

- **La DNase**

La DNase utilisée au laboratoire est généralement d'origine bovine (pancréas). C'est une endonucléase qui possède la propriété de couper une molécule d'ADN double brin au hasard, engendrant ainsi des fragments d'ADN double brin.

- **La nucléase S1**

La nucléase S1 (isolée d'un champignon, *Aspergillus oryzae*) n'attaque que l'ADN simple brin. Sont donc épargnés (à conditions de ne pas utiliser de grandes quantités d'enzyme) l'ADN double brin et les hybrides ADN/ARN.

- **Les exonucléases**

Les exonucléases grignotent les extrémités libres des molécules d'ADN en libérant des nucléotides. Par exemple, l'exonucléase III hydrolyse séquentiellement les extrémités 3' libres des molécules d'ADN dans le sens 3' vers 5'.

- **Les enzymes qui ligaturent : les ligases**

Pour lier, souder deux fragments d'ADN, on utilise une ligase, en présence. Il est plus facile de lier deux fragments à extrémités cohésives que deux fragments à coupure franche. La ligase choisie est en général la ligase du virus T4 (extraite de bactéries infectées par le virus T4).

Lorsqu'il existe une coupure (nick) d'un des deux brins d'une molécule d'ADN double brin, la ligase est également capable d'effectuer une ligation entre les deux nucléotides adjacents séparés par une brèche.

- **Les enzymes qui déphosphorylent : les phosphatases**

Les phosphatases catalysent l'élimination d'un groupement phosphate en 5' d'une chaîne d'ADN.

Il est courant de déphosphoryler un vecteur que l'on vient d'ouvrir par un enzyme de restriction, afin d'éviter une refermeture de ce vecteur (auto-ligation) qui empêcherait alors d'insérer le fragment d'ADN à étudier.

- **Les enzymes qui phosphorylent : les kinases**

Les kinases permettent le transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP. Il s'agit du phosphate en position gamma (le

plus externe des trois groupements fixés sur l'Adénosine). Il sera transféré à l'extrémité 5' d'un ADN déphosphorylé.

➤ **Les enzymes qui « recopient » un acide nucléique**

La copie d'une chaîne d'acides nucléiques, qu'il s'agisse de synthétiser une chaîne d'ADN ou d'ARN, s'effectue de manière complémentaire et antiparallèle (l'addition des nouveaux nucléotides se faisant dans le sens 5'phosphate vers 3' OH).

• **ADN-ADN**

Les ADN polymérases synthétisent une chaîne d'ADN à partir d'un modèle. En effet, une ADN polymérase n'est pas capable de commencer une chaîne d'acides nucléiques. Il est nécessaire d'apporter dans le milieu réactionnel, une amorce d'acide nucléique.

- **ADN polymérase I et enzyme de Klenow**

L'ADN polymérase habituellement utilisée est l'ADN polymérase d'E coli. Elle est constituée d'une seule chaîne peptidique et possède trois activités enzymatiques :

- une activité de synthèse ADN polymérase 5'-3' ;
- une activité de dégradation exonucléase 3'-5' expliquant ses propriétés d'enzyme « à fonction d'édition » ;
- une activité de dégradation exonucléase 5'-3'.

L'enzyme de Klenow est un enzyme très souvent utilisé au laboratoire, il est obtenu à partir de l'ADN polymérase I d'où l'on a éliminé, clivage avec une protéase, le petit fragment responsable de l'activité exonucléase 5'-3'. Il ne reste donc plus que les activités polymérase 5'-3' et exonucléase 3'-5' (fonction d'édition).

La suppression de l'activité exonucléase 3'-5' permet d'augmenter la processivité de la polymérase, ce qui permet de synthétiser des fragments de grande longueur.

- **Les ADN polymérases thermorésistantes**

La Taq polymérase a été la première à être identifiée. C'est une ADN polymérase isolée des bactéries vivant dans les sources d'eau chaude. Elle agit à une température voisine de 65°C. Cette propriété trouvera son utilité dans les réactions où il faut utiliser une ADN polymérase thermostable, comme dans la polymérase chain restriction PCR (réaction d'amplification d'ADN).

Elle peut aussi être utilisée dans les techniques de séquençages de l'ADN car elle permet de travailler à température élevée, donc d'abolir les structures secondaires.

➤ **ARN-ADN**

- **La rétrotranscriptase « RT » (ou transcriptase reverse)**

La RT est un enzyme isolé de rétrovirus (mais existant également ailleurs que dans les rétrovirus), qui permet de fabriquer un ADNc à partir d'un ARNm.

La RT est une ADN polymérase 5'-3' ayant les caractéristiques suivantes :

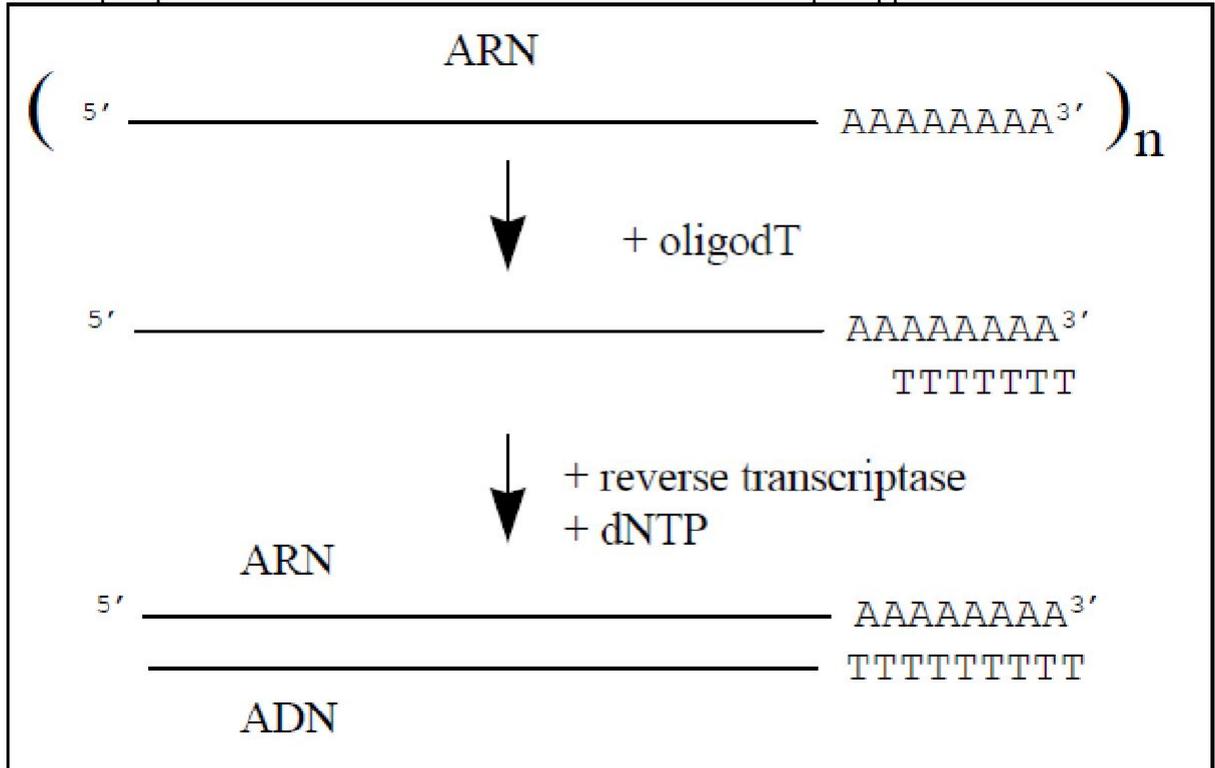
- elle est ARN dépendante ;

-elle est dépourvue d'activité exonucléase 3'-5' et est donc dénuée de fonction d'édition ; elle est ainsi encline aux erreurs :

-elle possède une activité RNase.

Elle permet de synthétiser le premier brin de l'ADNc (ADN double brin) à partir d'un ARNm. Une amorce oligo (dT) qui s'hybrideront au poly (A) de l'ARNm et permettra d'initier l'action de la RT, qui synthétisera une copie complémentaire de l'ARNm jusqu'à son extrémité.

Une réaction très utile se produit à la fin de la copie de l'ARNm. La RT provoque le retournement de l'extrémité 3' du transcrite sur lui-même. Elle « tourne le coin » et est prête à recopier son propre travail, ce qui crée une épingle à cheveu de 10 à 20 bp. Seules quelques bases à la toute extrémité de la boucle ne sont pas appariées.



➤ **ADN-ARN**

- **L'ARN polymérase**

L'ARN polymérase est utilisé pour effectuer des transcriptions in vitro. Il est capable de commencer une chaîne.

**1-2-2- Les vecteurs**

Les vecteurs sont des petites molécules d'ADN dans lesquels on insère le fragment d'ADN à étudier. Ces petits ADN sont généralement des virus bactériens (bactériophages) ou des plasmides. Ils possèdent dans leur génome les signaux nécessaires pour leur répllication, mais ils ne savent pas se multiplier seuls. Ils doivent être introduits dans des cellules hôtes (bactéries par exemple).

➤ **Les bactériophages**

Deux phages ont été très utilisés comme vecteurs dans les premiers temps de la biologie moléculaire. Ce sont les phages  $\lambda$  (lambda) et le phage M13, ou plus exactement des dérivés de ces deux phages qui doivent en effet subir divers types de modifications pour pouvoir être utilisés comme vecteurs de clonage. Le premier garde certaines applications, en particulier dans la construction des banques génomiques, et le second n'est plus guère utilisé.

- **Le phage  $\lambda$  (lambda)**

Plusieurs vecteurs sont dérivés du phage  $\lambda$  et peuvent être utilisés dans des constructions génétiques, essentiellement pour la constitution de banques d'ADNc ou génomiques.

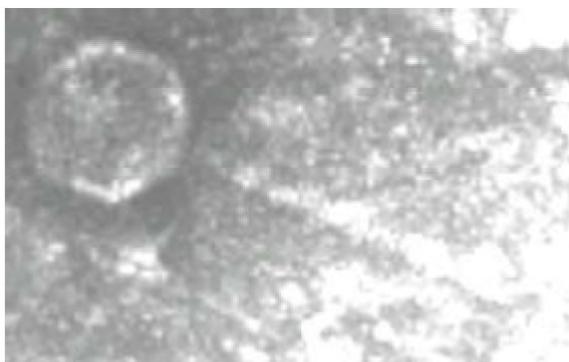
On distingue deux parties dans le phage  $\lambda$  :

-la tête du phage qui renferme l'ADN ;

-la queue du phage qui permettra au virus de se fixer sur la cellule hôte bactérienne

Le phage  $\lambda$  est un phage à ADN double brin, linéaire, d'une longueur de 48,5 Kb. Il comprend plusieurs dizaines de gènes et se multiplie dans les bactéries selon deux modes possibles, appelés lytique et lysogénique.

L'ADN du phage  $\lambda$  naturel, non modifié, dit «sauvage », contient plusieurs sites de restriction identiques, il n'est donc pas envisageable d'y insérer un fragment d'ADN qui risque d'être coupé avec d'autres fragments. Donc les vecteurs  $\lambda$  modifiés contiennent des sites de restriction mutés.



Phage  $\lambda$  (microscopie électronique)

- **Le phage M13**

M13 est un bactériophage spécifique d'*E.coli*, dont le génome, après avoir été modifié, a été très utilisé pour sous-cloner de petits fragments d'ADN.

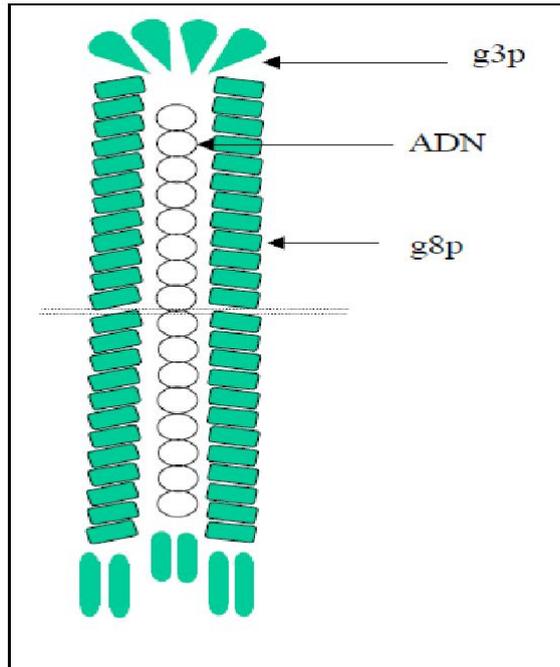
M13 est constitué d'un simple brin d'ADN circulaire, d'une longueur d'environ 6,4 Kb, appelé (+) par convention. Cet ADN comprend dix gènes.

L'infection d'une bactérie *E.coli* par M13 s'effectue via le pilus sexuel codé par un plasmide F (F pour facteur de fertilité) que l'on trouve seulement chez les bactéries mâles.

A la différence du phage  $\lambda$ , l'ADN du phage n'a pas de longueur limitée et les particules phagiques sont produites sans lyse de la bactérie.

Divers modifications ont été apportés au phage M13 sauvage afin d'en faire un vecteur de clonage efficace : introduction d'un polylinker.

**Qu'est qu'un polylinker ?** C'est un petit fragment nucléotidique double brin synthétisé chimiquement, introduit dans un vecteur (phage ou plasmide) afin d'offrir tout un choix de sites de restriction uniques, c'est-à-dire tous différents les uns des autres et n'existant pas par ailleurs dans ce vecteur. Grâce au polylinker introduit dans la forme répliquative du phage M13, un fragment d'ADN étranger, préparé avec un enzyme de restriction reconnaissant un site du polylinker, pourra donc être inséré au site voulu.

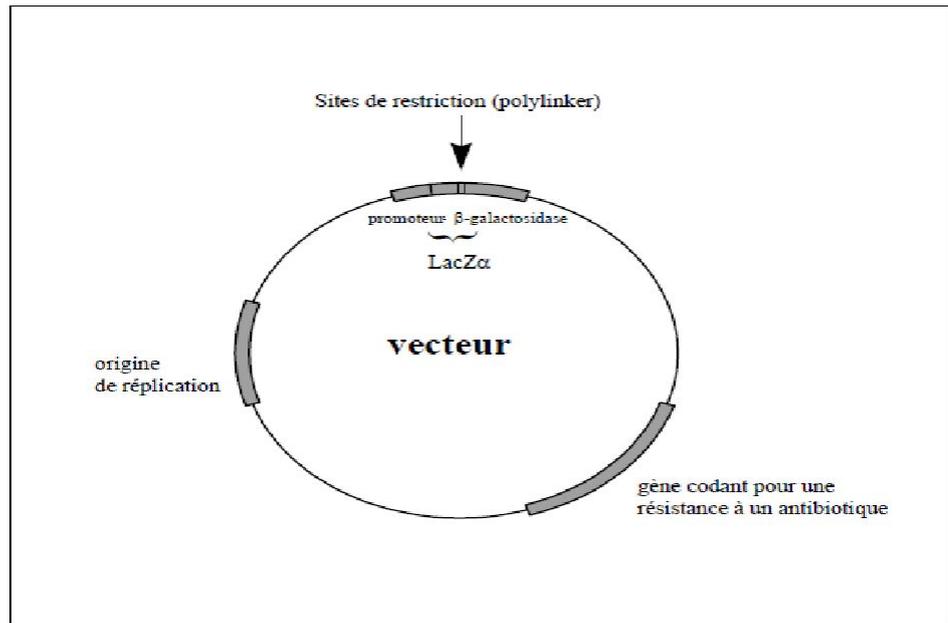


➤ **Les plasmides**

Les plasmides représentent un autre type de vecteurs que les phages et sont également utilisés. Ce sont de petits fragments d'ADN circulaire double brin, que l'on trouve dans certaines bactéries en dehors du chromosome. Ils se répliquent grâce à des enzymes dans la bactérie.

Selon les types de plasmide, le nombre de plasmides par bactérie varie. Certains plasmides ne sont présents que sous forme d'une seule copie (car ils se répliquent une seule fois à chaque division cellulaire). D'autres sont au contraire en plus grand nombre, 15 à 20, (car ils se répliquent plusieurs fois par cycle cellulaire).

On utilise au laboratoire des plasmides artificiels créés à partir de plasmides naturels auxquels certaines séquences ont été ajoutées. La plupart des plasmides actuels est issue des plasmides pBR322 et de la série pUC.



- **pBR322**

pBR322 est un plasmide qui possède deux gènes de résistance, l'un à l'ampicilline, l'autre à la tétracycline. L'insertion d'un ADN étranger pouvait se faire dans l'un ou l'autre de ces deux sites. Seule persistait la résistance à l'antibiotique due à celui des deux gènes n'ayant pas reçu l'insert, ce qui permettait ainsi une sélection des plasmides recombinants.

- **pUC**

pUC (plasmid of University of California) est un plasmide de 2,69 Kb dont les caractéristiques sont comparables à celles de M13 mp18.

- **Bluescript**

Bluescript n'est pas à proprement dit un plasmide mais un phagmide. C'est un vecteur artificiel hybride : phage filamenteux-plasmide, qui combine l'avantage des phages M13 (récupération possible d'ADN sous forme simple brin), et celui des plasmides (possibilité d'obtenir un insert double brin plus long et plus stable). Ses propriétés de phage filamenteux ont été oubliées avec le temps et la disparition de l'utilisation de l'ADN simple brin. Seules les propriétés de plasmide en font aujourd'hui le vecteur de clonage le plus utilisé.

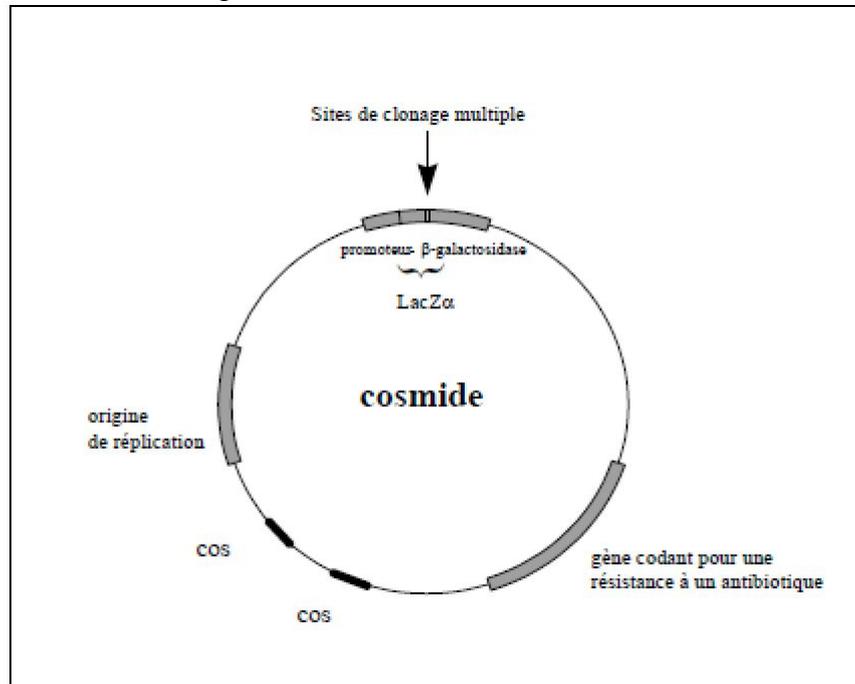
➤ **Les cosmides**

Les cosmides sont des vecteurs artificiels hybrides : plasmide-phage  $\lambda$ . L'avantage des cosmides est qu'il est possible de cloner de plus grands fragments d'ADN étranger (35 à 45 Kb) qu'avec les vecteurs dérivés du phage  $\lambda$  (23 Kb maximum). Ils servent à fabriquer des banques génomiques et sont utilisés plus spécialement lorsque le gène étudié s'étend par exemple sur une longueur de 30 à 40 Kb.

Ainsi un cosmide dont la taille est approximativement de 5 Kb peut recevoir un ADN étranger de 33 à 47 Kb. Donc, un cosmide :

- entre dans *E.coli* comme un phage  $\lambda$  ;
- s'y multiplie comme un plasmide.

Les cosmides sont des plasmides possédant des sites de restriction où l'on peut insérer l'ADN étranger. Ils renferment également un gène de résistance à l'ampicilline.



- **Les banques YAC et BAC (yeast or bacterial artificial chromosome)**  
Il est maintenant possible de cloner de grands fragments d'ADN, longs de 200 à 500 Kb, voire plus, sous forme de chromosomes artificiels, dans la levure ou dans la bactérie.  
Le principe de cette technique consiste à doter les grands fragments d'ADN à cloner des éléments nécessaires pour que la levure ou la bactérie les réplique comme s'il s'agissait de ses propres chromosomes.

### 1-2-3- Les cellules-hôtes

La cellule-hôte destinée à recevoir le vecteur, phage ou plasmide (ou cosmide), doit répondre à certaines conditions :

- **Choix de la souche**  
Une des premières conditions est que la souche d'*E. coli*. choisie ne soit pas pathogène pour l'homme. C'est le cas par exemple des souches *E. coli*. K12. Ces souches ont la particularité de ne pas coloniser l'appareil digestif humain. Mais elles synthétisent l'enzyme de restriction EcoK (enzyme de type I qui reconnaît le site : AAC et GTGC). Il faut utiliser des souches dérivées ne synthétisant pas l'enzyme de restriction EcoK (ou qui modifient les sites EcoK) sinon tout ADN à étudier possédant un site EcoK serait clivé.
- **Croissance en milieu liquide**

Après une phase initiale de latence, la croissance d'E coli. est exponentielle, le nombre de bactérie double toutes les 20 minutes. Lorsque le substrat et l'oxygène ne sont plus en conditions optimales, la croissance ralentit. Puis la culture entre en phase stationnaire, les bactéries meurent aussi vite qu'elles se divisent. Finalement c'est la mort cellulaire.

➤ **Distinction entre infection, transformation et transfection**

- **Infection**

Dans l'infection, la bactérie est mise en contact avec le virus.

L'infection par le phage  $\lambda$  en phase lytique se traduit par l'apparition de plages de lyse. L'infection par le phage M13 (ou par le virus  $\lambda$  en phase lysogénique) aboutira à des colonies bactériennes contenant ces virus.

- **Transformation**

La transformation consiste à mettre en contact un ADN double brin (plasmide) et les bactéries prétraitées (on dit compétentes). Dans ces conditions, l'ADN pénétrera dans les bactéries et pourra s'y répliquer.

- **Transfection**

La transfection, enfin, concerne essentiellement les cellules de mammifères et se rapproche de la transformation des bactéries. Elle consiste à faire entrer dans les cellules un ADN double brin, soit en fragilisant la membrane plasmique (électroporation, agents chimiques), soit en incluant l'ADN dans des gouttelettes lipidiques (liposomes) qui seront internalisées par les cellules (lipofection), soit encore en formant avec l'ADN un précipité de phosphate de calcium qui entrera dans les cellules.

**1-2-4- Les sondes nucléiques**

✓ **Caractéristiques des sondes**

Les sondes nucléiques sont des segments d'acides nucléiques que l'on utilise pour repérer de manière spécifique, dans une réaction dite « d'hybridation moléculaire », le fragment d'acide nucléique auquel on s'intéresse.

Une sonde possède les caractéristiques suivantes :

-c'est un segment d'acide nucléique (ADN ou ARN) n'ayant obligatoirement qu'un brin ; elle peut être plus ou moins longue selon les cas et peut ne posséder qu'une vingtaine de nucléotides (sonde oligonucléotidique) ou plusieurs centaines de nucléotides ;

-elle est complémentaire et antiparallèle du segment d'acide nucléique à reconnaître, cette reconnaissance pouvant se faire entre ADN-ADN (ou ADN-ARN ou ARN-ARN) ; bien évidemment, dans cette réaction d'hybridation moléculaire, il faut que les acides nucléiques à reconnaître soient également sous forme monobrin ;

-la sonde peut couvrir tout ou une partie du segment d'acide nucléique à reconnaître ; elle est capable de détecter sa copie complémentaire parmi des milliers de fragments d'ADN ou d'ARN différents.

-une sonde doit être repérable : des sondes radioactives sont le plus souvent utilisées ; il est ainsi facile de repérer l'emplacement de cette sonde et par conséquent le clone à identifier qui se sera hybridé avec cette sonde.

#### ✓ **Hybridation moléculaire : Stringence**

L'utilisation de sondes d'acides nucléiques repose bien entendu sur la complémentarité des deux brins d'ADN, qui peuvent être dans certaines circonstances dissociés, puis réassociés avec la sonde repérable.

Si l'on chauffe de l'ADN, il se produit, à une certaine température « température de fusion », une rupture des liaisons hydrogène entre les bases. La double hélice se défait, les deux brins se séparent : on dit que l'ADN est dénaturé. Plus il y a de bases C : G dans un ADN, plus la température de fusion sera élevée. Ceci se comprend aisément, étant donné que les bases C : G sont reliées par trois liaisons hydrogène, alors que les bases A : T ne sont reliées que par deux liaisons hydrogène.

La dénaturation de l'ADN est réversible : quand la température est abaissée progressivement, les deux brins d'ADN peuvent s'hybrider à nouveau c'est-à-dire se rapprocher selon les règles de complémentarité de bases (renaturation). D'où la nécessité de refroidir brusquement pour maintenir une dénaturation souhaitée. Cette hybridation est mise à profit pour identifier la séquence d'intérêt : l'introduction de molécules d'ADN marqué (sonde) dans la mixture de séquences d'ADN dénaturées, permettra l'hybridation de la sonde avec la séquence recherchée.

#### ✓ **Obtention d'une sonde**

Toute la difficulté consiste bien évidemment à obtenir une sonde spécifique de l'ADN à étudier. Plusieurs possibilités existent. Peuvent être utilisées comme sonde les molécules ci-dessous :

##### ➤ **ADNc**

L'ADNc constitue une excellente sonde. En pratique on utilise le plus souvent un fragment de restriction cloné couvrant la plus grande partie possible de l'ADNc. Encore faut-il avoir pu construire l'ADNc correspondant, ce qui n'est pas toujours le cas, surtout lorsque l'on débute l'étude d'un gène.

##### ➤ **ARNm**

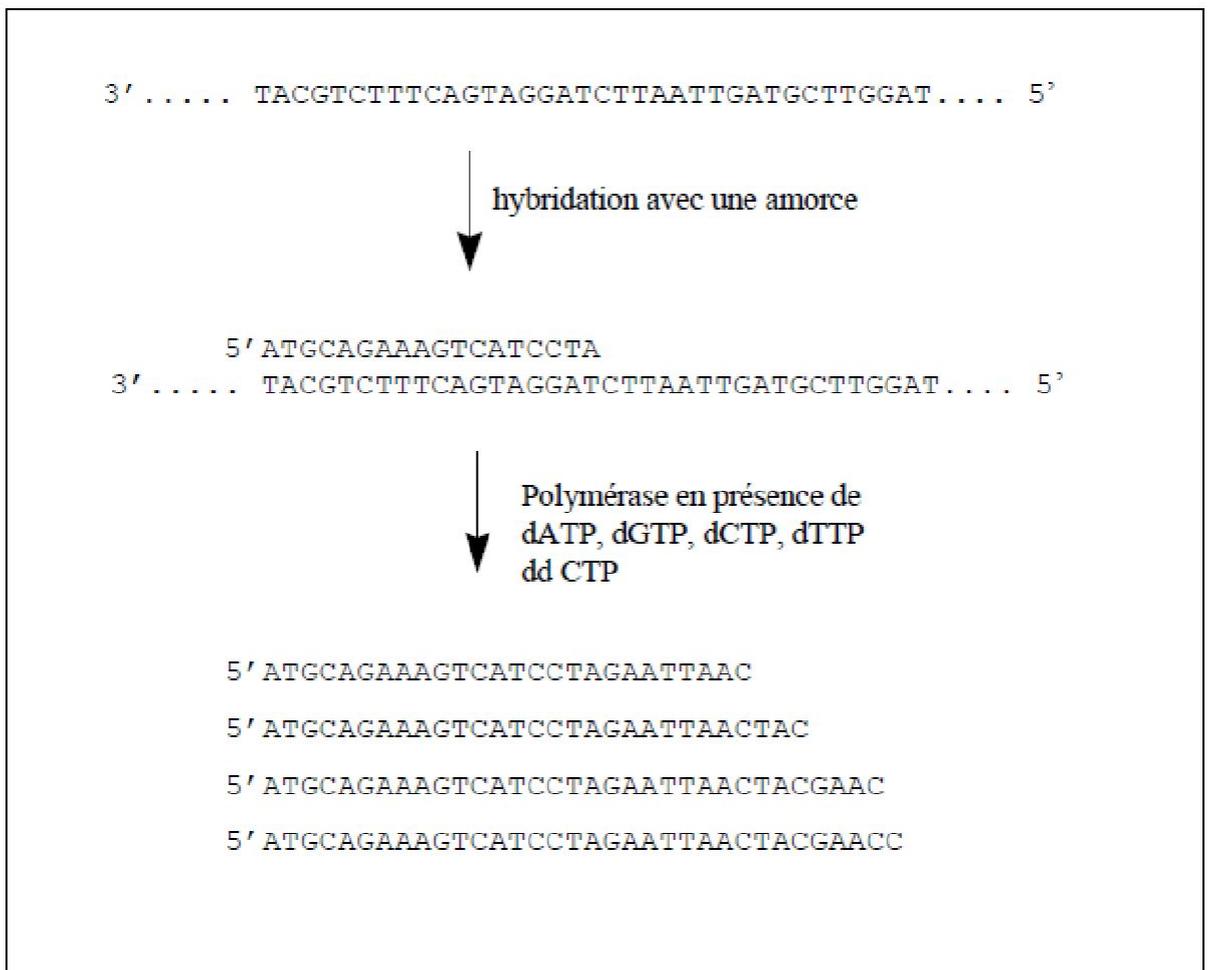
L'ARNm peut également servir de sonde, mais cette fois encore, on ne dispose pas toujours de l'ARNm spécifique.

##### ➤ **Oligonucléotides de synthèse**

- Si la séquence de l'ADN n'est pas connue, il faut purifier une petite quantité de la protéine correspondant au gène étudié, déterminer la

séquence des acides aminés d'un court segment de cette protéine, on déduit d'après le code génétique la séquence de segment d'ADN correspondant et synthétiser alors de court sondes d'ADN. On peut imaginer les difficultés rencontrées lorsque le segment protéique séquencé contient des acides aminés tels que Leu, Ser ou Arg codés par six codons différents ! Il faut alors synthétiser tout un ensemble de ces courtes sondes d'ADN afin de couvrir toutes les possibilités.

- Si la séquence d'une partie d'ADN à repérer est connue, il devient alors beaucoup plus facile de synthétiser une sonde d'une vingtaine de nucléotides. Il existe des appareils automatiques (« synthétiseurs d'oligonucléotides ») qui permettent d'assembler jusqu'à une centaine de nucléotides dans l'ordre souhaité.



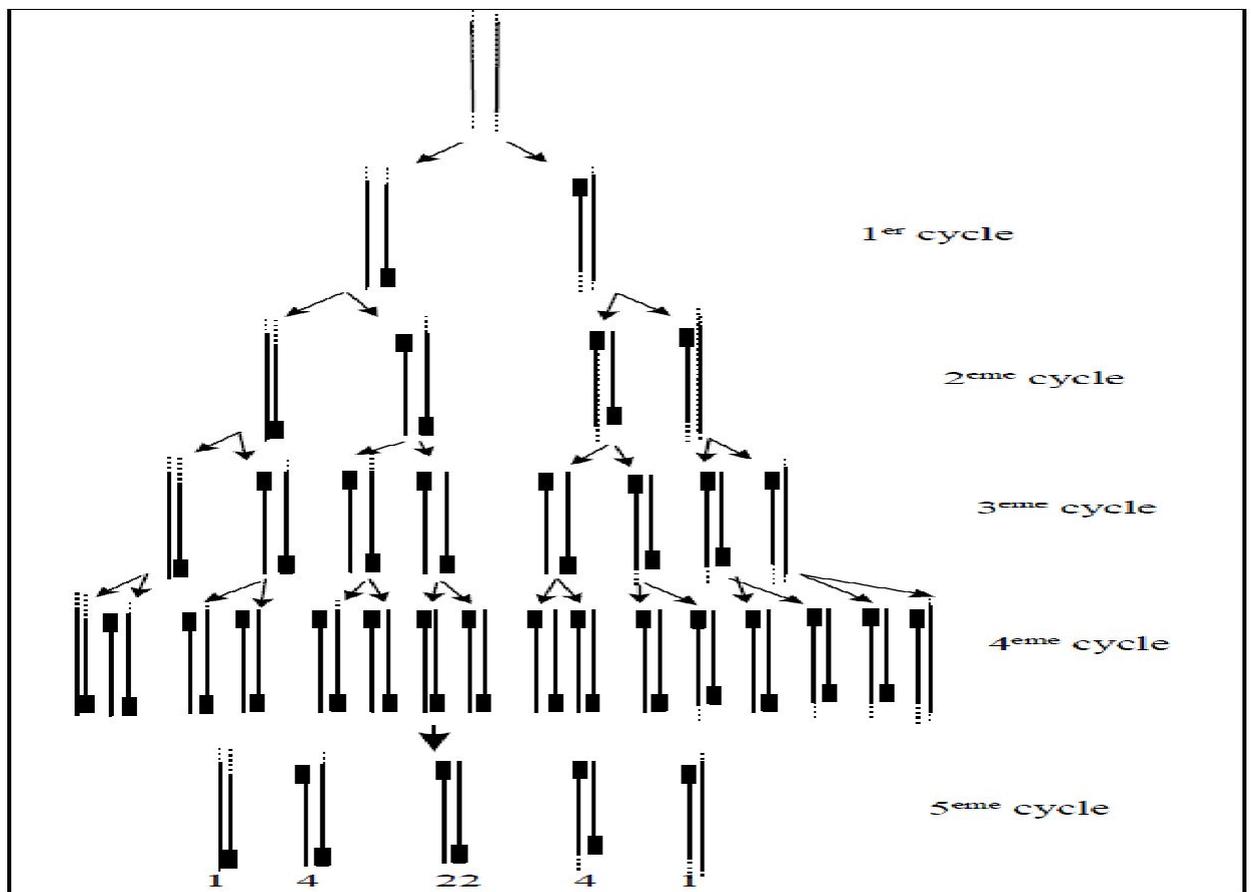
## 2- Quelques techniques générales de biologie moléculaire

### 2-1- PCR

L'amplification en chaîne par polymérase ou réaction en chaîne par polymérase (PCR est l'abréviation anglaise de *polymerase chain reaction*, l'acronyme français ACP pour

Amplification en Chaîne par Polymérisation est très rarement employé), est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de copier 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) ou amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides). Cette technique permet entre autres de détecter la présence du virus VIH ou de mesurer la charge virale (concentration du virus dans le plasma), des OGM (organismes génétiquement modifiés), des virus des hépatites B, C et D. De plus en plus utilisée en criminalistique, cette technique est basée sur la combinaison de deux facteurs :

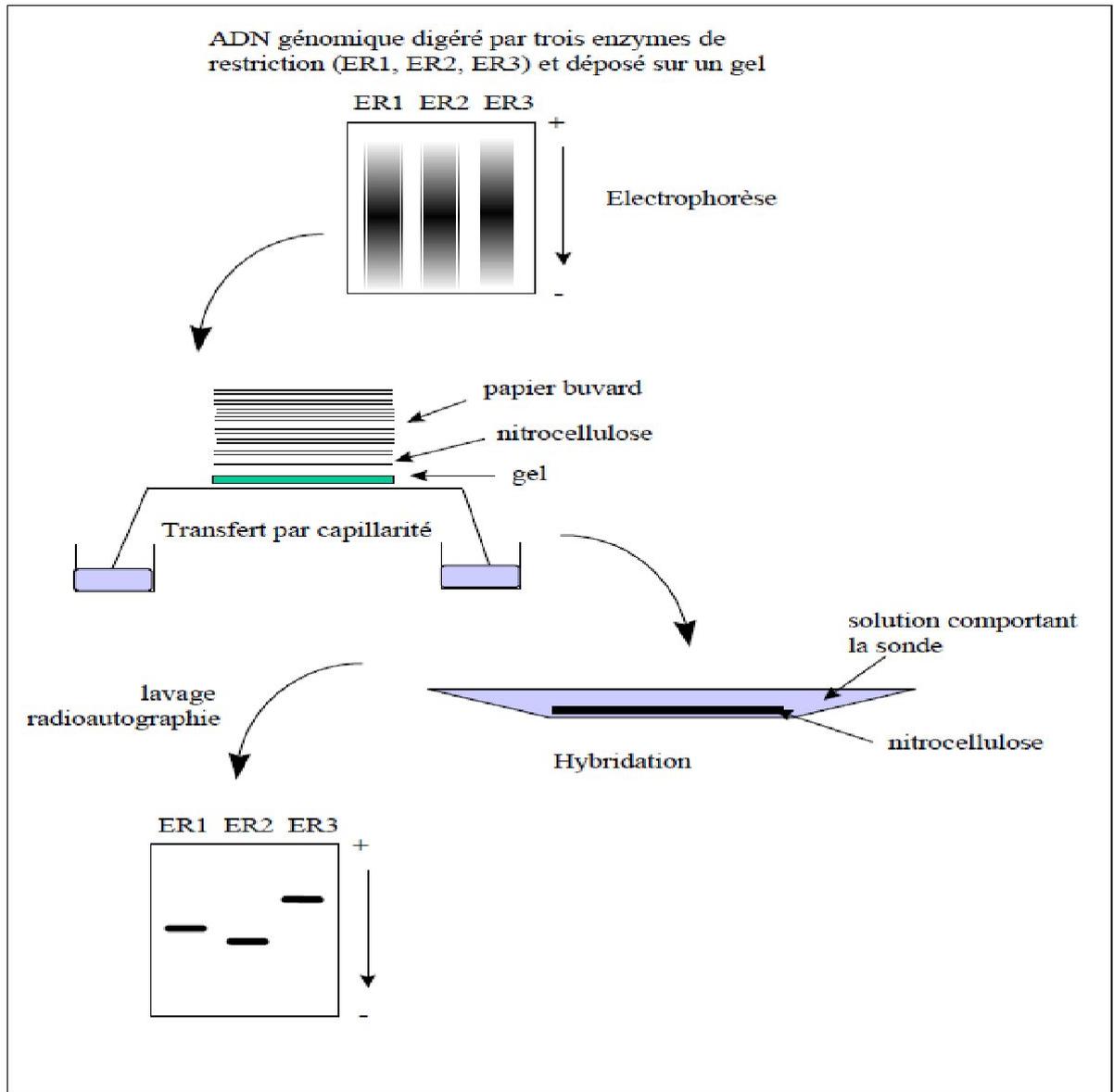
- Les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation spécifique à l'ADN double brins spécifique des ADN polymérases dépendantes à l'ADN thermostables.
- Les propriétés d'hybridation et de deshybridation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température.



## 2-2- Southern blot

Un **transfert d'ADN** est une méthode de biologie moléculaire permettant l'analyse de l'ADN. Elle a été inventée par Edwin Southern, un professeur britannique de biologie moléculaire. C'est ce nom qui a, par jeu de mot, inspiré l'appellation de deux autres techniques : Western blot et Northern blot.

Nous partons des fragments d'ADN obtenus par les enzymes de restriction. On va appliquer la technique du transfert de Southern pour fixer les sondes aux fragments leur correspondant ; une sonde étant un fragment d'ADN auquel on a marqué une base grâce à des composés radioactifs, fluorescents ou un anticorps qui sert à localiser une séquence de l'ADN qui nous intéresse. Le transfert de Southern sert donc à repérer des fragments d'ADN. D'une façon plus générale, ces fragments obtenus vont présenter des polymorphismes de restriction. Un polymorphisme de restriction est une variation individuelle de la séquence des bases du génome des eucaryotes modifiant un ou plusieurs sites de restriction. Donc, ces polymorphismes de restriction (mutations) vont, dans les faits, être intéressants pour déterminer des variations géniques, des tests de paternité par exemple.



### 2-3- Northern blot

Elle dérive du Southern blot, sauf qu'au lieu d'étudier de l'ADN, on étudie de l'ARN. L'ARN va être analysé par électrophorèse et détecté par une sonde. Une différence du procédé par rapport au transfert de Southern est l'utilisation de formaldéhyde dans le gel d'électrophorèse

comme dénaturant, parce que le traitement d'hydroxyde de sodium utilisé en transfert de southern dégraderait l'ARN. Comme dans le transfert de Southern, la sonde d'hybridation peut être faite à partir d'ADN ou d'ARN.

#### **2-4- RFLP**

En biologie moléculaire, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (ou RFLP, de l'anglais *restriction fragment length polymorphism*) est utilisé dans deux sens :

- comme une caractéristique des molécules d'ADN permettant de les distinguer les unes des autres,
- comme la technique de laboratoire qui utilise cette caractéristique pour différencier ou comparer des molécules d'ADN. Cette technique est utilisée pour la réalisation d'empreintes génétiques et dans les tests de paternité.

L'ADN d'un individu ou d'une cellule est d'abord extrait et purifié. L'ADN purifié peut être amplifié par PCR. L'ADN est ensuite coupé en fragments de restriction par une enzyme de restriction, cette dernière coupant l'ADN au niveau d'une séquence qui lui est spécifique (site de restriction). Les fragments d'ADN ainsi obtenus, nommés fragments de restriction, sont ensuite séparés selon leur longueur par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel obtenu est ensuite analysé par Southern Blotting et révélé avec une ou plusieurs sondes.

La distance entre deux sites de coupure de l'enzyme de restriction (site de restriction) varie selon les individus (du fait du polymorphisme des individus) : de ce fait la longueur des fragments de restriction varie. Les positions de certaines bandes d'ADN (sur le gel d'électrophorèse) seront donc différentes d'un individu à l'autre. 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. Elle permet également de montrer les relations génétiques qui peuvent exister entre individus, du fait de la transmission des caractères génétiques de parents à enfant. La technique est également utilisée pour étudier les relations entre différentes espèces.