

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA
FACULTE DE MEDECINE
Département de médecine

2^{ème} Année médecine
Cours de Génétique

**OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE : EXTRACTION DE
L'ADN, PCR, SEQUENCAGE DE L'ADN.**

Elaboré par :
Dr DJEBIEN. S

Année universitaire : 2019-2020

GENIE GENETIQUE

I. Extraction des acides nucléiques :

- Un grand nombre de méthodes sont utilisées pour effectuer l'extraction des acides nucléiques. Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques va dépendre du type cellulaire utilisé (cellules de mammifères, eucaryotes, plantes, bactéries, virus, etc), du matériel de départ (organe entier, tissu, culture cellulaire, sang, etc), du résultat escompté (pureté, temps de préparation, quantité attendue, etc) et des applications envisagées (PCR, Southerne Blot, etc)
- L'étude de l'ADN est menée à partir de tout tissu disponible, frais ou congelé, y compris à partir de taches de sang séché après recueil sur papier (carte de Guthrie', de frottis buccaux, de cheveux mais également de prélèvement de placenta, de cellules en culture. Habituellement l'ADN est extrait à partir des leucocytes du sang circulant recueilli sur anticoagulant.
- Il existe de nombreuses méthodes permettant d'extraire les acides nucléiques : extraction phénol/chloroforme, extraction saline, colonnes d'affinité composées de silice, lysat leucocytaires. La qualité de l'extraction est en général appréciée par l'absence de protéines, de lipides et d'autres constituants cellulaires qui pourraient interférer avec les enzymes de restriction, les ligases ou les ADN polymérases.
- La méthode de référence pour l'extraction des acides nucléiques emploie le phénol/chloroforme. Dans un premier temps les cellules sont lysées en présence d'un détergent tel que dodécylsulfate de sodium (SDS). Une déprotéinisation est réalisée par de la protéinase K dans le tampon de lyse. Cette enzyme est active en présence de SDS et reste fonctionnelle à température élevée (56 à 65 °C). Sous ces conditions dénaturantes, les protéines sont mieux digérées par la protéinase K.
- L'extraction de phase en présence de phénol et de chloroforme permet de purifier les acides nucléiques et de récupérer, en fonction du PH de la phase organique, l'ADN ou l'ARN dans la phase aqueuse. Les acides nucléiques sont ensuite précipités en présence d'alcool. Le précipité est ensuite repris dans de l'eau stérile.
- L'ADN purifié se conserve bien à 4°C. les successions de congélation-décongélation peuvent entraîner une dégradation de l'ADN et doivent être évitées. L'ARN est conservé à -80°C. le stockage à long terme de l'ARN peut nécessiter l'addition d'un inhibiteur de RNase.
- Le dosage d'une solution homogène d'acides nucléiques est réalisée par spectrophotométrie à 260 nm. La mesure de l'absorbance à 280 nm permet de s'assurer de l'absence de contamination significative par les protéines.
- La qualité de l'extraction des acides nucléiques est également évaluée par électrophorèse en gel d'agarose. Après coloration par le bromure d'éthidium (BET), une bande de haut poids moléculaire est observée pour l'ADN. Pour l'ARN, doivent être observées deux bandes correspondant à la présence d'ARNr 28S et 18S (l'absence de haut poids moléculaire signe l'absence de contamination par l'ADN)

II. METHODES DU GENIE GENETIQUE:

A. Polymerase Chaine Reaction (PCR):

- La méthode d'amplification génique in vitro, a été décrite par Kary Mullis en 1983.
- Elle permet de localiser avec précision les mutations et de détecter les mutations ponctuelles, les micro-insertions et les délétions.
- La PCR est une méthode très précise permettant la détection de très faibles quantités d'acides nucléiques.

Principe de la méthode:

- Il repose sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le bras complémentaire d'un ADN de séquence connue servant de matrice.
- L'ADN à amplifier est déposé dans un milieu comportant des nucléotides: ATP, CTP, TTP et GTP; une ADN polymérase et du magnésium, indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs.
- Pour initier le processus, deux amorces, complémentaires des brins à amplifier sont ajoutées au milieu.
- L'association des amorces à l'ADN cible est suivie de l'élongation de celui ci par la polymérase.
- La PCR se déroule en un cycle de 3 étapes: la dénaturation thermique des amorces et de l'ADN cible, l'hybridation des amorces et leur extension.

1. La dénaturation thermique:

- L'ADN double brin est chauffé à 94°C. Cette température est supérieure à la température de fusion de l'ADN (T_m).
- Ceci provoque la rupture des liaisons hydrogène et séparation des deux brins. L'ADN simple brin sert alors de matrice pour l'amplification.

2. Hybridation des amorces:

- La température est ensuite abaissée en dessous du T_m des amorces (45 à 70°C en fonction de la séquence).
- Les amorces, chacune complémentaire de l'un des brins délimitent la séquence à amplifier et s'hybride à tout ADN simple brin comportant la séquence complémentaire.
- Les amorces ou primer est une courte séquence d'Ac nucléique, souvent un nucléotide de synthèse, qui se lie spécifiquement à une séquence cible d'acide nucléique simple. L'amorce initie la synthèse d'un brin complémentaire, en présence d'une polymérase appropriée.

3. Elongation et extension des amorces:

- Pour l'élongation on utilise généralement la Taq polymérase, qui supporte les températures élevées.
- La polymérase allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléotides complémentaires à la matrice.
- La synthèse s'effectue dans le sens 5'→3' à 72°C.
- On recommence ensuite un nouveau cycle. Chaque cycle permet le doublement du nombre des copies. Une trentaine de cycles génèrent près de 2³⁰ copies de L'ADN cible.

Intérêt de la PCR:

- Détection des mutations ponctuelles, micro insertions, délétions.
- Renseigne sur la localisation des mutations.

B. Le séquençage de l'ADN:

La méthode de Sanger, de terminaison des chaînes par un didésoxy:

- Consiste à obtenir des copies de la molécule d'ADN dont on veut obtenir la séquence en utilisant une ADN polymérase. On prépare 4 milieux réactionnels pour le séquençage dont chacun contient : l'ADN matrice sous forme simple brin, de l'ADN polymérase, les 4 dNTP (désoxynucléotide triphosphate) et un ddNTP (didésoxyribonucléotide triphosphate) différent.
- Il y a 4 ddNTP qui correspondent aux 4 bases de l'ADN.
- Suivant le ddNTP qui est présent, la synthèse se termine à l'endroit où ce nucléotide modifié est incorporé.
- Les ddNTP provoquent la terminaison de la synthèse de façon aléatoire au niveau de chacune des 4 bases, à l'endroit où elles apparaissent dans l'ADN matrice.
- L'effet global est que chacune des 4 préparations, est produite une série de molécules d'ADN de différentes longueurs qui se termine en une position où dans la matrice est présente la base complémentaire de celle de la forme ddNTP est présente dans le milieu réactionnel considéré.

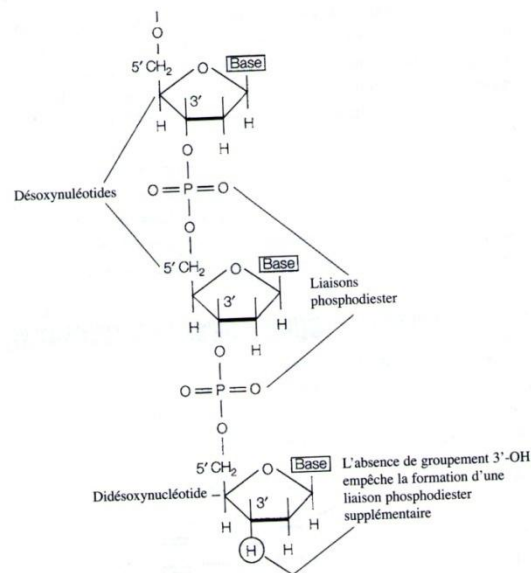


Fig. 1. Terminaison de la synthèse d'ADN par des didésoxynucléotides.

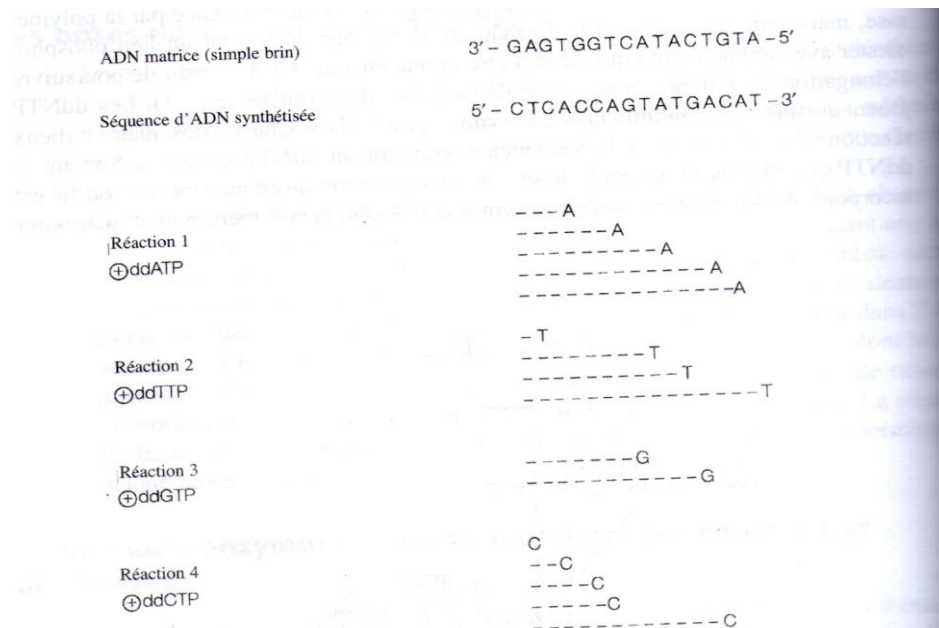


Fig. 2. Séquençage par la méthode enzymatique de terminaison de la chaîne par didésoxy.

- Exemple: dans la préparation contenant du ddATP, est produite une série de molécules d'ADN qui se terminent par toutes par un A correspondant à un T dans la matrice.
- Les molécules d'ADN synthétisées sont séparées suivant leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec les 4 préparations versées sur 4 lignes parallèles du gel.
- Si on ajoute des dNTP contenant du phosphore ou du soufre radioactif dans les préparations de séquençage, les ADN synthétisées deviennent radioactif, ce qui permet de les détecter en plaçant le gel de polyacrylamide contre une feuille de film sensible aux rayons X: **autoradiographie**.
- Lorsqu'on développe le film, on peut observer une série de bandes dont chacune des lignes du gel.
- Les séquences de l'ADN matrice peut alors déterminée en identifiant les plus petites bandes et les bandes de plus en plus grosses.

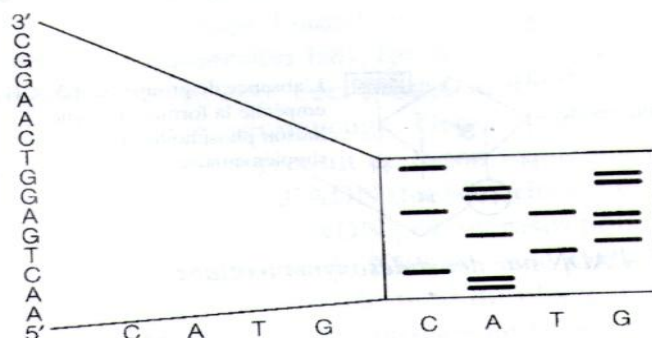


Fig. 3. Motif en échelle obtenu après séquençage d'ADN et électrophorèse.