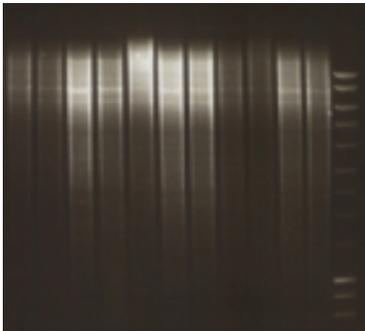


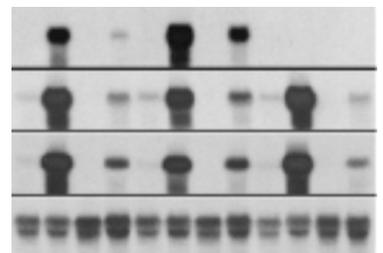
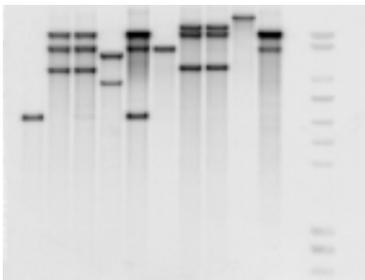
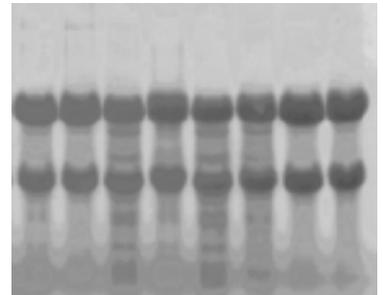
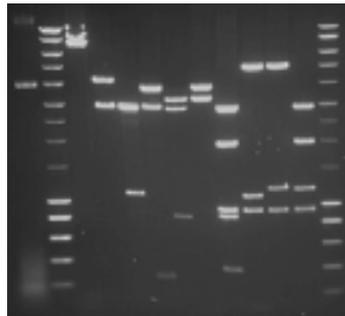
Unité d'Enseignement de L3

Biologie Moléculaire des Génomes

Organisation, Maintien et Expression

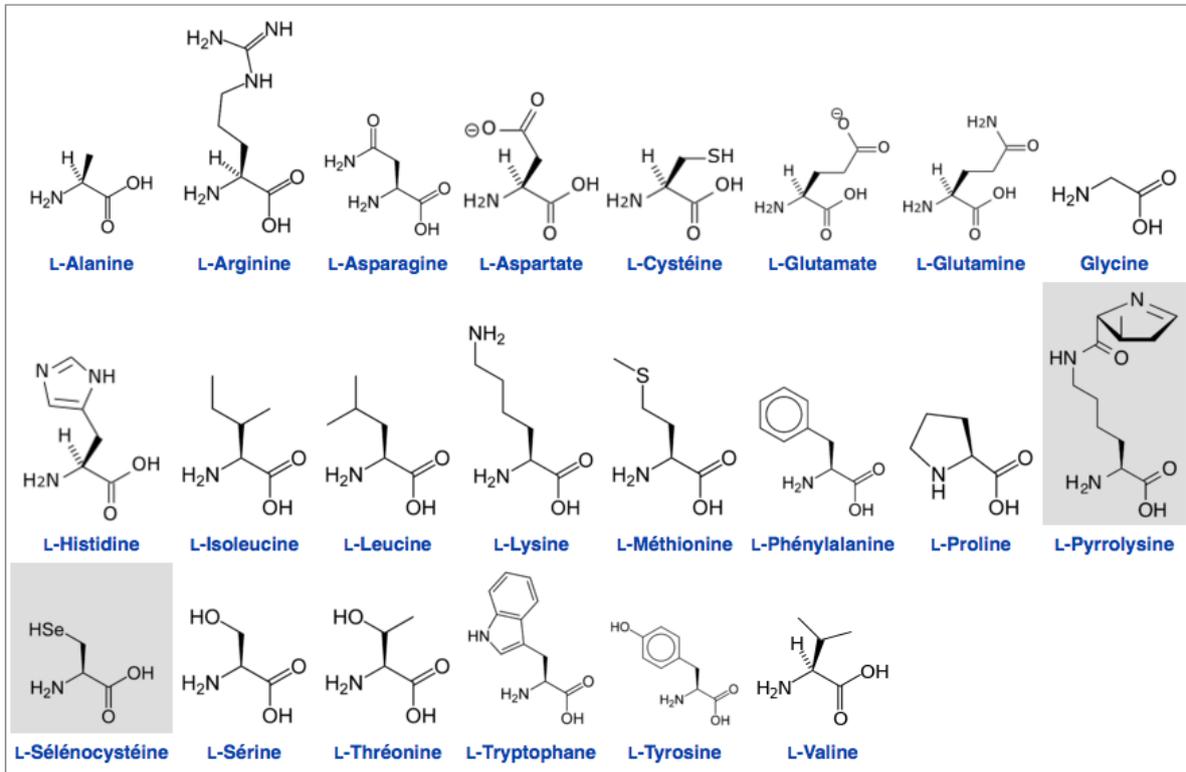


Annexes

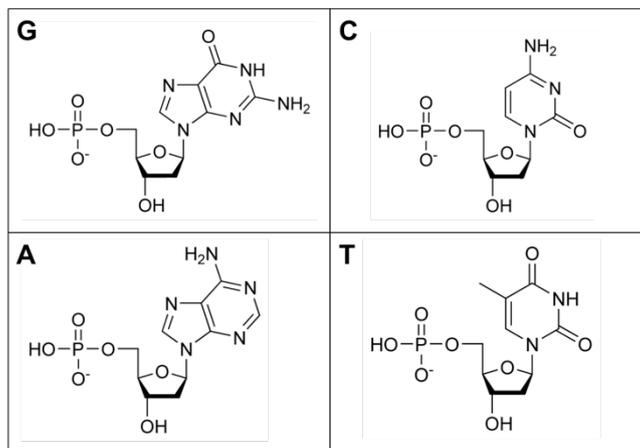


Quelques données

Structure des acides aminés



Structure des nucléotides

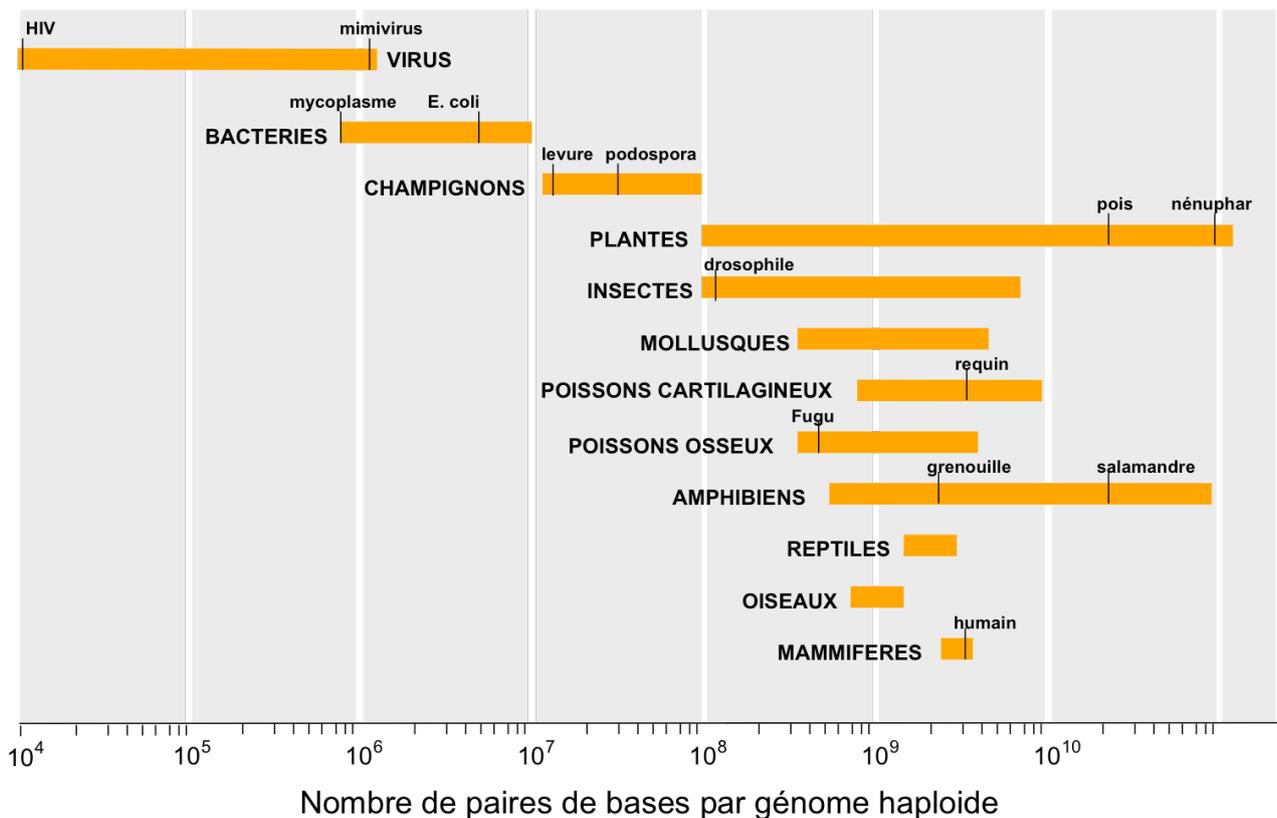


Code génétique

		Deuxième lettre								
		U		C		A				G
Première lettre (côté 5')	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U	
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G	

codon d'initiation codon de terminaison

Taille de quelques génomes



Taille de quelques génomes - Suite

Nom		Taille génome (pb)	Nombre de chromosome	Estimation du nombre de gènes
Bactériophage ΦX174	Virus	5 x 10 ³	ssADN	11
<i>HIV-1</i>	Virus	9.7 x 10 ³	ssARN	9
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Archaea	1.9 x 10 ⁶	1	2000
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie	4.6 x 10 ⁶	1	4200
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levure	12 x 10 ⁶	16	6200
<i>Mitochondrie levure</i>	Organite	85 x 10 ³	1	8
<i>Aspergillus nidulans</i>	Fungi	30 x 10 ⁶	8	9500
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Animal	100 x 10 ⁶	6	20000
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plante	150 x 10 ⁶	5	26000
<i>Chloroplaste Arabidopsis</i>	Organite	150 x 10 ³	1	104
<i>Danio rerio</i>	Poisson	1,2 x 10 ⁹	48	15000
<i>Mus musculus</i>	Souris	2,5 x 10 ⁶	40	20000
<i>Homo sapiens</i>	Homme	3 x 10 ⁹	46	26000
<i>Mitochondrie Homme</i>	Organite	17 x 10 ³	1	13
<i>Zea mais</i>	Plante	5 x 10 ⁹	10	55000
<i>Pinus taeda</i>	Plante (pin)	23 x 10 ⁹	12	15000
<i>Polychaos dubium</i>	Amibe	290 x 10 ^{9*}		

ss: single stranded = simple brin

* : taille estimée car génome non séquencé

Principe de l'électrophorèse

Les acides nucléiques sont des macromolécules formées par la polymérisation des nucléotides ; ils sont chargés négativement par l'ionisation d'une fonction de l'acide phosphorique de chaque nucléotide. De ce fait, sous l'effet d'un champ électrique, ils peuvent migrer sur un support solide (gel) et être séparés. C'est ce qu'on appelle l'électrophorèse. La charge relative étant constante (et juste utilisée comme élément moteur), la discrimination entre les molécules sera due à l'effet de filtration du gel utilisé.

La **vitesse de migration** d'une molécule d'acide nucléique sera fonction :

- de **sa masse moléculaire** donc du **nombre de bases** (ou de paires de bases). Plus une molécule sera de faible masse moléculaire, plus sa vitesse de migration sera grande, et plus elle migrera à distance des puits.

- de **sa conformation**, qui va affecter sa pénétration dans le gel. Ainsi, les trois formes possibles pour un plasmide seront séparées, pourtant chacune de ces trois formes contient le même nombre de bases. Il s'agit de la forme circulaire relâchée (très encombrante), de la forme linéaire, de la forme circulaire surenroulée (plus compacte et donc de migration plus rapide). C'est pourquoi, on compare uniquement entre elles des molécules ayant les mêmes conformations.

- de la **concentration** d'acrylamide ou d'agarose **du gel**.

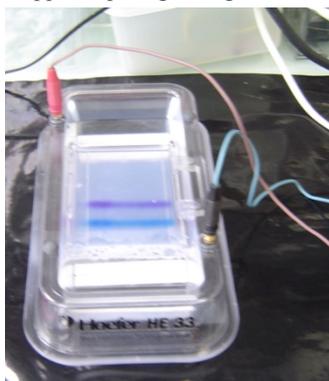
La séparation d'un mélange d'acides nucléiques donné est fonction du choix de la nature du support de l'électrophorèse (gel d'agarose ou polyacrylamide), le diamètre des pores du gel utilisé étant dépendant de la concentration du gel.

- **le gel d'agarose** : constitue le support le plus utilisé. Les tailles de fragments qu'il est possible de séparer sur un tel support sont comprises entre une centaine de paires de bases et 20 000 pb, en fonction du pourcentage d'agarose. Plus ce pourcentage est grand, plus le gel est dense, et plus la résolution se fera pour des petites tailles. La migration est (en général) horizontale.

- **le gel de polyacrylamide** : Il est très résolutif, contrairement au gel d'agarose, permettant de séparer des molécules de petits poids moléculaires (inférieur à 1000 pb). Il est notamment utilisé pour séparer les produits issus d'une réaction de séquençage, c'est-à-dire des molécules qui ne diffèrent entre elles que par un seul nucléotide.

Le gel est coulé entre deux plaques de verre à l'abri de l'oxygène (qui inhibe la réaction de polymérisation), la migration est verticale.

Appareil pour gel d'agarose



Appareil pour gel de polyacrylamide



Gel de polyacrylamide



La visualisation des acides nucléiques au sein du gel se fait par coloration du gel au bromure d'éthidium (BET). Ce composé est un agent qui s'intercale entre les plateaux des paires de bases, et qui une fois dans cet environnement hydrophobe, pourra émettre une fluorescence orange après son excitation par des UV courts (200-300 nm). Le seuil de détection est de quelques nanogrammes d'acide nucléique. La comparaison visuelle de la fluorescence d'un échantillon avec celle d'une quantité d'ADN connue (l'échelle de taille) permet **d'estimer la quantité** d'acides nucléiques déposée et aussi la **taille d'un fragment** (à condition que les deux ADN soient du même type). Le simple brin et le double brin n'intercalent pas la même quantité de BET, et donc ne fluorescent pas avec la même intensité après excitation. De même pour des fragments d'ADN de conformation différente.

Enzymes utilisés en biologie moléculaire

Enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des **endonucléases**, c'est-à-dire des protéines capables d'hydrolyser des liaisons phosphoester entre deux nucléotides à l'intérieur de la chaîne d'ADN, les deux brins de l'ADN étant ainsi digérés. Cette coupure n'est pas aléatoire, mais elle a lieu, selon les enzymes, soit au niveau d'une séquence nucléotidique précise, soit dans son voisinage (les enzymes qui coupent dans la séquence reconnue étant les plus couramment utilisées, voir les exemples donnés). Cette séquence spécifique est appelée un **site de restriction**, et est propre à chaque enzyme de restriction.

Les enzymes de restriction sont naturellement présentes chez les bactéries où elles participent à un mécanisme de défense contre les infections par les bactériophages : le système de restriction-modification. En effet, si un phage injecte son ADN génomique dans une bactérie qui produit une telle enzyme de restriction, cette enzyme va couper l'ADN phagique au niveau de ses sites de restriction, ce qui va aboutir à bloquer l'infection par destruction du génome viral. Parallèlement à la production de l'enzyme de restriction, la bactérie produit également une autre enzyme, une méthylase, qui reconnaît le même site que l'enzyme de restriction sur l'ADN génomique de la bactérie, mais qui va modifier cette séquence en ajoutant des groupements méthyles. Cette méthylation empêche l'action de l'enzyme de restriction sur le site méthylé. Le rôle de la méthylase est donc de protéger le génome de la bactérie contre l'action de l'endonucléase. On dénombre aujourd'hui plusieurs centaines d'enzymes de restriction différentes, dont beaucoup sont commercialisées.

En biologie, les enzymes de restriction sont utilisées :

- Pour établir des cartes de restriction. Une carte de restriction donne la position et l'ordre des sites de restrictions pour différentes enzymes le long d'une molécule d'ADN. Cette carte dépend uniquement de la séquence primaire de la molécule d'ADN. Elle permet de prédire la taille des fragments de digestion et est utilisée pour caractériser un ADN précis. Les cartes de restriction peuvent aussi être utilisées pour mettre en évidence un polymorphisme de restriction, notamment au sein d'une population.

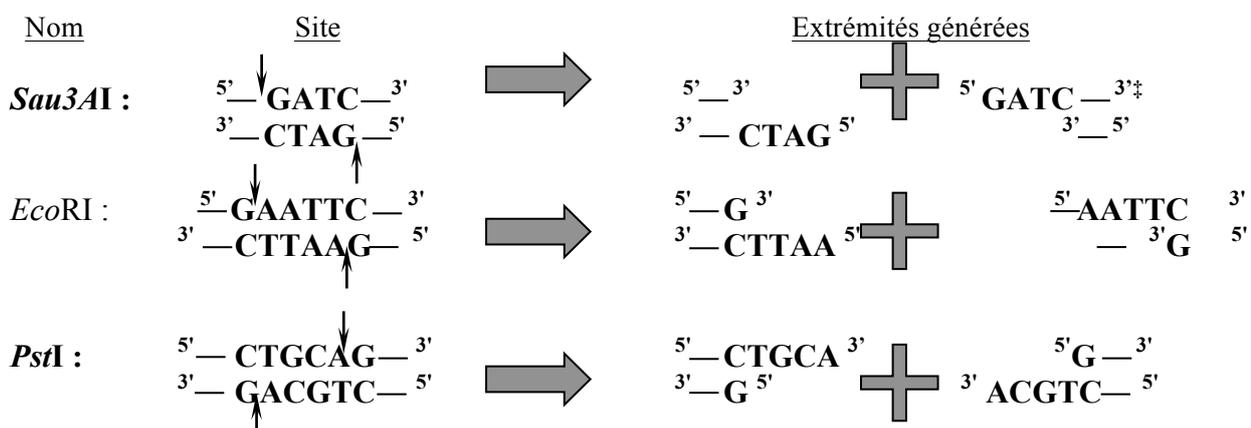
- Pour cloner ou modifier (par ajout ou délétion) une séquence d'ADN, en association avec d'autres enzymes couramment utilisées en biologie moléculaire, comme la ligase.

En règle générale, les enzymes de restriction utilisées dans ce type d'expérience sont des endonucléases qui coupent à l'intérieur de leur site de restriction, site qui est souvent palindromique (qui peut se lire dans les deux sens) de 4, 6 ou 8pb et parfois plus. On distingue alors deux types d'enzymes en fonction des extrémités qui génèrent :

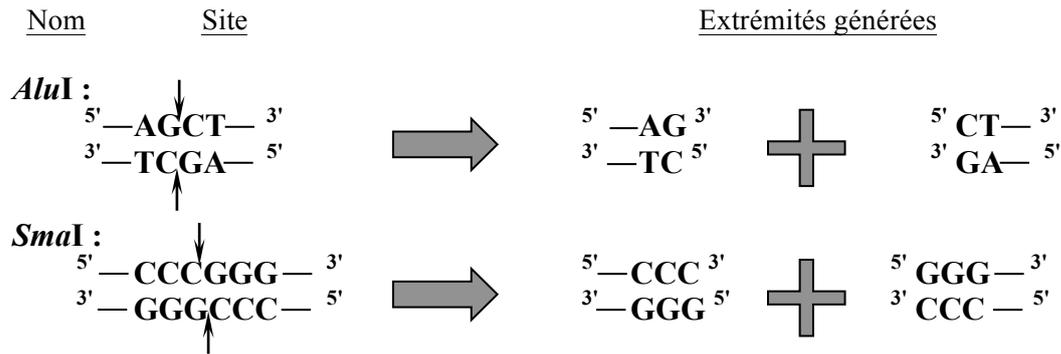
- Si la coupure a lieu au milieu du site, donc au même endroit sur les deux brins, les extrémités des molécules d'ADN ainsi créées seront à **bouts francs**.

- Par contre, si la coupure est décalée sur les deux brins, alors elle n'aura pas lieu au même endroit sur les deux brins et cela générera des extrémités à **bouts collants** (dits aussi à **bouts cohésifs**).

Quelques exemples d'enzymes de restriction donnant des extrémités à bouts collants:



Quelques exemples d'enzymes de restriction donnant **des extrémités à bouts francs**:



Autres enzymes utilisés en biologie moléculaire

DNase I : génère des coupures simple brin sur des duplex d'ADN. Une incubation prolongée provoque la dégradation complète de l'ADN.

ADN ligase : catalyse la formation d'une liaison covalente entre un 3'OH d'une molécule d'ADN et/ou d'ARN avec le 5' phosphate d'une autre molécule d'ADN et/ou d'ARN. Ceci nécessite la consommation d'un ATP. La spécificité de substrat est variable d'une enzyme à l'autre. Ex : la T4 DNA ligase ne forme les liaisons phosphoester que sur des substrats ADN double brin.

ADN polymérase I : enzyme extraite de *E. coli* qui a trois activités: (1) activité ADN polymérase ADN-dépendante nécessitant une amorce, (2) activité exonucléase de 5' vers 3', et (3) activité exonucléase de 3' vers 5'. Le **Fragment de Klenow** est obtenu par digestion protéolytique de cette enzyme et ne porte plus l'activité (2).

Nucléase S1 : dégrade rapidement l'ADN simple brin. Une coupure sur un brin dans un duplex suffit pour que la nucléase S1 clive la liaison sur le brin complémentaire. La **nucléase Mung-Bean** a la même activité.

Phosphatase alcaline : catalyse l'hydrolyse des phosphates 5'-terminaux de molécules d'ADN ou d'ARN.

Polynucléotide Kinase : catalyse le transfert d'un groupement γ -phosphate de l'ATP sur un 5'OH terminal d'un ADN.

RNase H : ribonucléase qui dégrade l'ARN des hétéroduplex ARN/ADN.

RNase III : Endonucléase liant et clivant spécifiquement les ARN double brin.

Taq polymérase : possède une activité ADN polymérase ADN-dépendante nécessitant une amorce. Elle est très résistante à la chaleur et son optimum de fonctionnement est 72°C.

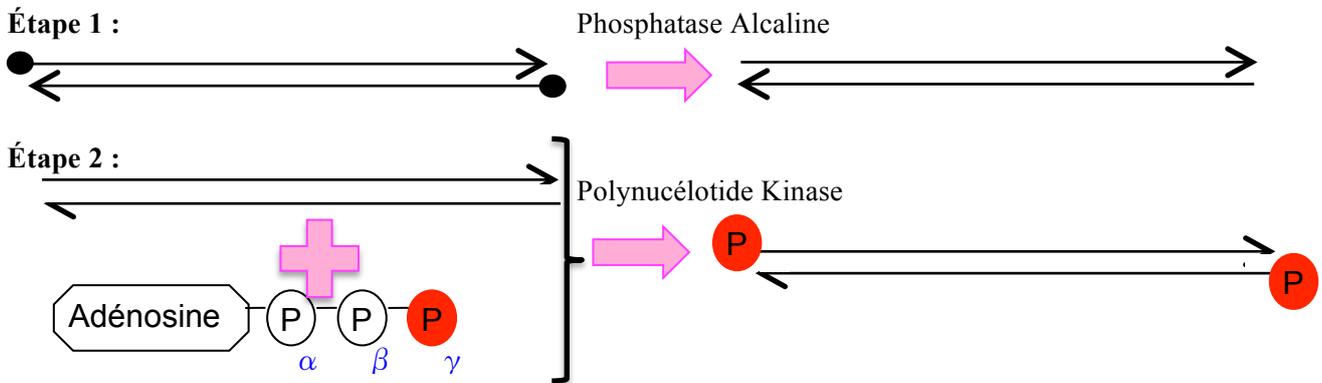
Terminal transférase : polymérise l'addition de nucléotides aux extrémités 3'OH de molécules d'ADN.

Transcriptase inverse : polymérase qui a pour matrice de l'ARN et des déoxyribonucléotides triphosphates comme substrats. Le plus souvent, elle nécessite un oligonucléotide comme amorce pour initier la polymérisation.

Marquage de l'ADN - Réalisation de sonde

a) Marquage en extrémité 5' :

Ce marquage s'effectue en deux étapes avec en premier l'élimination du groupement phosphate à chaque extrémité 5' grâce à l'action de la phosphatase alcaline. Puis en seconde étape, action de la polynucléotide kinase (PNK) qui va ajouter un groupement phosphate sur l'extrémité 5', en présence d'ATP- γ -P³².



Notes :

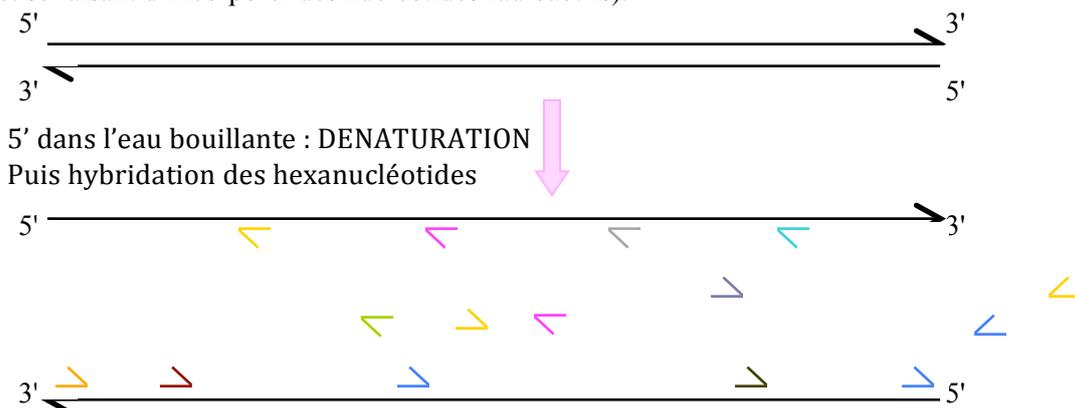
a) La sonde peut correspondre à un fragment d'ADN double brin (cf le schéma ci-dessus) ou bien à un oligonucléotide (courtes séquences simples brins). Les oligonucléotides sont synthétisés chimiquement, ils possèdent des extrémités 5'OH (ils sont non phosphorylés), ils peuvent donc être marqués directement par la PNK.

b) Le marquage en extrémité 5' donne lieu à des sondes faiblement marquées, car celles-ci ne possèdent qu'un seul atome radioactif par brin. Ce type de marquage n'est donc pas utilisé pour réaliser des sondes pour des expériences de Southern ou de northern blot. Par contre, ce marquage est essentiel pour les expériences d'empreinte, de cartographie à la nucléase S1 et d'extension d'amorce. Ces trois techniques sont décrites plus loin.

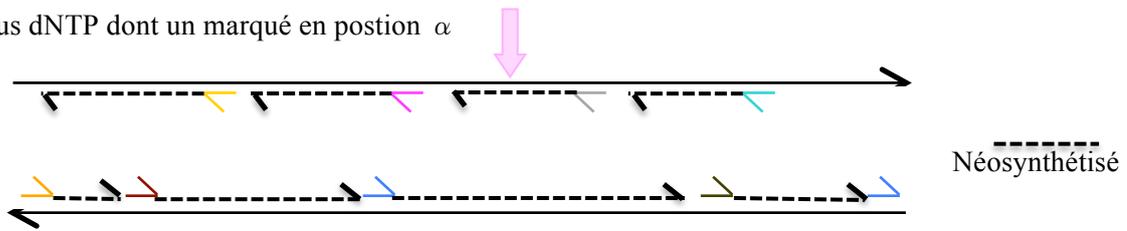
b) Marquage le long de la molécule : La méthode d'amorçage aléatoire ou "random priming"

Ce marquage s'effectue sur un **ADN dénaturé** par un chauffage de 5 min à 95°C. On ajoute à l'ADN dénaturé les composants suivants (dans un tampon réactionnel adéquat):

- Le fragment de **Klenow** (voir plus haut).
- Des **dNTP**, dont un est marqué en position α (si radioactif : dNTP- α -P³²).
- Des hexanucléotides aléatoires, c'est-à-dire un mélange d'oligonucléotides simple brin, longs de 6 bases et qui représentent l'ensemble des combinaisons possibles de séquence pour 4 bases sur une longueur de 6. Ils vont servir d'amorces pour la polymérase, après leur hybridation par complémentarité de séquence sur l'ADN matrice dénaturé (leurs séquences étant aléatoires, et représentant toutes les combinaisons possibles, il y aura forcément hybridation d'un certain nombre de ces oligos sur l'ADN matrice). Ces oligos vont donc servir d'amorce à la polymérase, lui permettant de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN matrice et se faisant d'incorporer des nucléotides radioactifs).



Klenow plus dNTP dont un marqué en position α



c) Marquage le long de la molécule : par PCR

Il suffit de réaliser une PCR (voir plus loin) en utilisant parmi les 4 dNTP, un dNTP- α -P³². Cette technique nécessite de connaître au préalable la séquence de la sonde (ou au moins la séquence de ces extrémités pour définir les amorces).

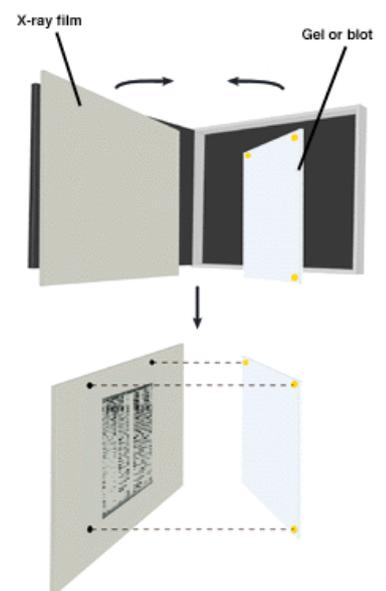
Remarques :

a) Quelle que soit la méthode de marquage employée, la sonde doit être **dénaturée** (chaleur ou soude) avant d'être utilisée sur une membrane de Southern ou de Northern-blot. Par contre, pour des expériences de retards sur gels ou d'empreinte, la sonde ADN doit être utilisée sous forme double brin.

b) En dehors des sondes radioactives, il existe d'autres méthodes de marquages des acides nucléiques avec des nucléotides modifiés porteurs de fluorochromes ou de motifs antigéniques (par exemple digoxygénine), leur incorporation au sein de la sonde s'effectue en utilisant les techniques d'amorçage aléatoire ou de PCR.

Principe de l'autoradiographie

Une autoradiographie est une technique d'imagerie réalisée à partir d'un composé radioactif mis en contact d'un film. Elle permet de mettre en évidence la présence de molécules marquées radioactivement et également d'effectuer une mesure semi-quantitative afin de déterminer la concentration de cette molécule dans un échantillon (cellule, gel d'agarose ou d'acrylamide, membrane de transfert). En général, l'autoradiographie consiste à marquer une cellule ou un constituant cellulaire (ADN, ARN, protéine, anticorps) à l'aide d'un radioisotope (P³², P³³, S³⁵, H³, C¹⁴), puis à recouvrir la préparation d'un film photographique sensible. Les particules β émises par les atomes radioactifs vont réduire les ions argent en atomes d'argent métallique. Après exposition du film, celui-ci est révélé comme une photographie classique en passant dans un bain de révélateur puis dans un bain de fixateur. Les atomes d'argent métallique donnent alors lieu à une marque sombre. Plus cette marque est sombre et épaisse et plus il y a eu émission de radioactivité. Un écran à phosphore peut être utilisé à la place du film photographique et dans ce cas la révélation nécessite un appareil appelé phosphoimager. Cette technique est couramment utilisée pour révéler les northern-blot et les Southern-blot.

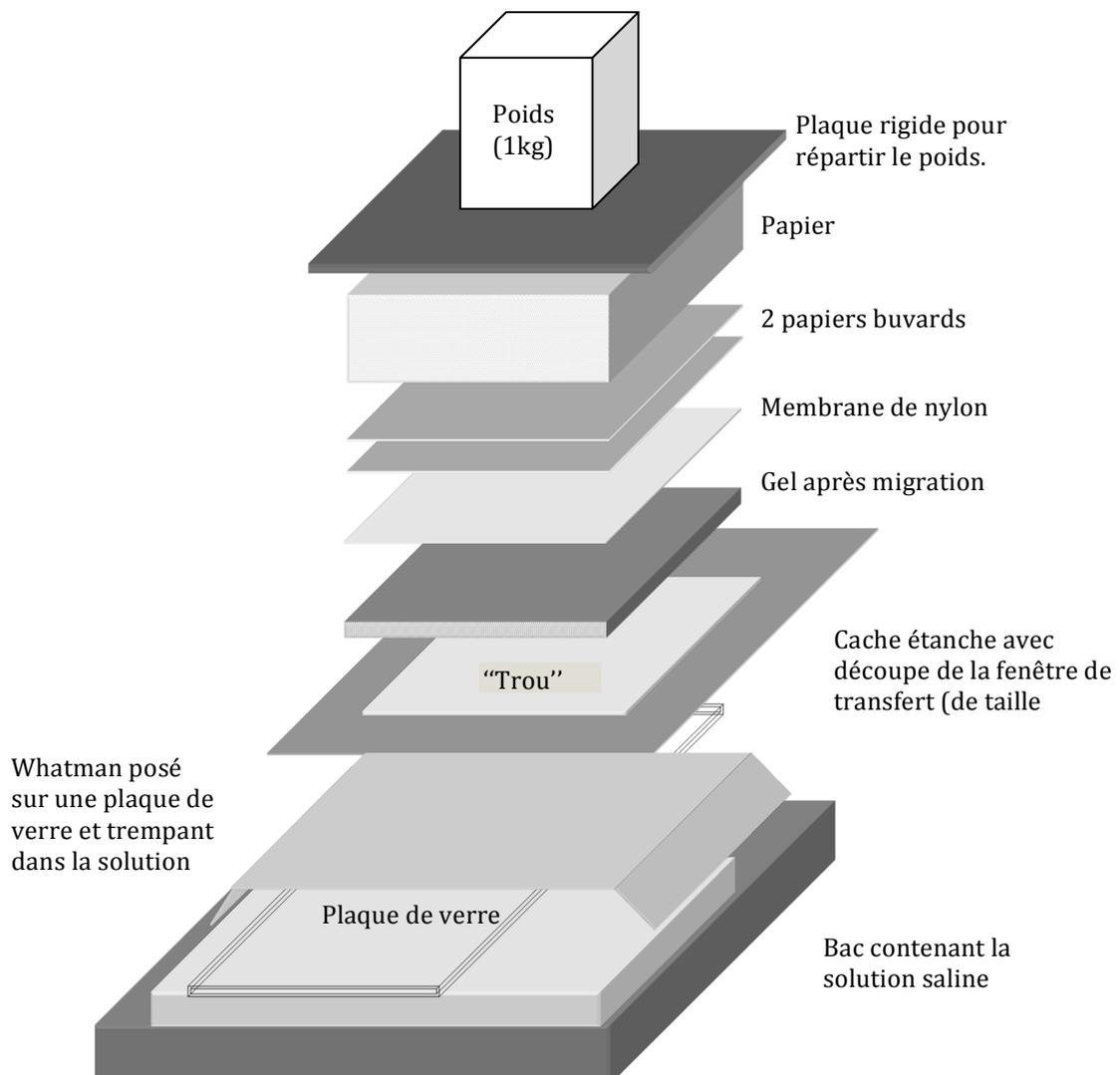


Typiquement, un film est déposé à la surface du gel (d'ADN, d'ARN ou de protéine) ou de la membrane et l'ensemble est enfermé dans une cassette (étanche à la lumière) pendant un temps donné. Le développement du film révélera la quantité et/ou la qualité des molécules séparées sur gel. Attention à l'orientation de votre film lors de l'analyse !

Southern et Northern-blot

Les étapes, qui précèdent ce montage, sont dans l'ordre :

<u>Cas du Southern-blot</u>	<u>Cas du northern-blot</u>
- Extraction des ADN	- Extraction des ARN
- Digestion des ADN par des enzymes de restriction. <u>But</u> : fragmenter de façon spécifique les ADN	- Dénaturation des ARN : par chauffage à 95°C ou par action d'agents dénaturants (comme le glyoxal ou la formaldéhyde). <u>But</u> : 1) Éliminer les structures secondaires pour que la migration soit uniquement en fonction de la taille. 2) Rendre les ARN accessibles à l'hybridation avec la sonde.
- Migration électrophorétique en gel d'agarose <u>But</u> : Séparation des produits de digestion en fonction de leur taille.	- Migration électrophorétique en gel d'agarose. Ce gel et le tampon de migration peuvent également contenir des agents dénaturants. <u>But</u> : Séparation des molécules d'ARN en fonction de leur taille.
- Dénaturation des ADN <i>in situ</i> dans le gel par son immersion dans un bain de soude. <u>But</u> : Dénaturation des fragments d'ADN afin de les rendre accessibles aux molécules de sondes.	
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> ↻ - Transfert sur membrane de Nylon (ou de nitrocellulose) ↻ </div> <p style="text-align: center;">Voir le schéma ci-dessous.</p>	

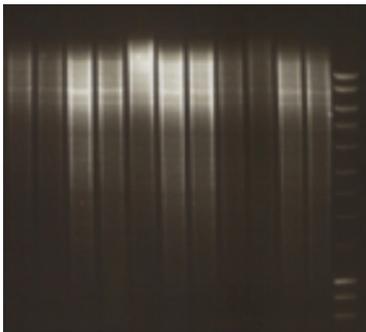


Les étapes qui suivent le transfert sont identiques pour le Southern et le northern-blot :

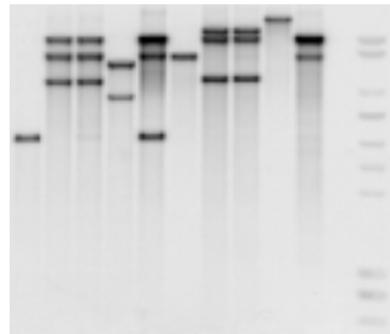
- **Hybridation avec la sonde dénaturée** (Rappel : une sonde = un fragment d'ADN ou d'ARN rendu détectable par un marquage spécifique – en règle générale pour un Southern ou un northern-blot, il s'agit d'une sonde ADN plutôt que de nature ARN).
- **Lavage** (élimination des sondes fixées sur la membrane de façon non spécifique, c'est-à-dire non en interaction via une complémentarité de séquence).
- Révélation de la position des sondes (pour une sonde radioactive : autoradiographie).

Exemple :

Cas d'un Southern-blot

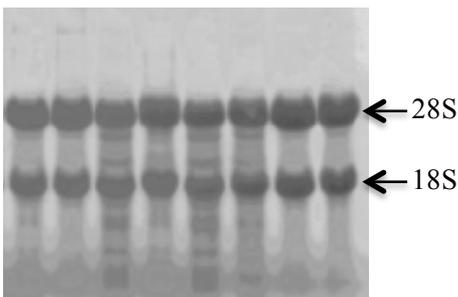


Photographie sous UV du gel d'agarose (+BET), après migration. L'ADN génomique, extrait du champignon *Aspergillus nidulans* a été digéré par *EcoRI*.

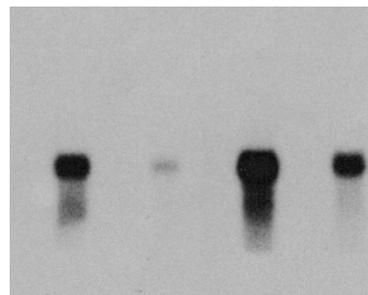


Autoradiogramme : Le gel ci-contre a été traité et son contenu transféré sur une membrane de nylon, puis cette membrane a été mise en contact avec une sonde radioactive. Après lavage, une autoradiographie a été réalisée.

Cas d'un northern-blot

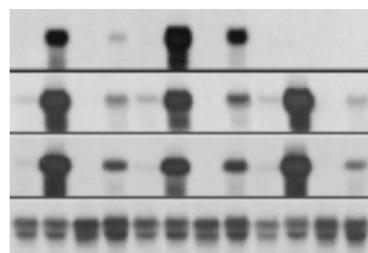


Photographie de la membrane de nylon après coloration des ARN par du bleu de méthylène. Les ARN ribosomiques 28S et 18S sont indiqués. Les ARNr 5S et les ARNt ne sont pas visibles car sortis du gel au cours de la migration. Les ARNm, minoritaires en quantité, sont visibles sous forme d'un « smear », une traînée, s'étalant du 28S jusqu'au bas du gel.



Autoradiogramme : La membrane a été mise en contact avec une sonde radioactive. Après lavage, une autoradiographie a été réalisée.

Remarque : Dans les publications scientifiques, les différentes hybridations réalisées sur un même northern sont présentées sous forme d'un montage sur la même figure. Voir ci-dessous.



SDS-PAGE et western-blot

Le western-blot est l'équivalent pour les protéines du northern-blot vis à vis des ARN. Ainsi, le western-blot a pour but de visualiser une espèce particulière de protéine au sein d'un extrait cellulaire, afin d'en connaître la taille et le niveau d'**accumulation**.

La migration des protéines dans un gel de polyacrylamide, peut être influencée par trois paramètres :

- La charge : selon leur composition en résidus acides ou basiques, et en fonction du pH du milieu.
- La conformation : suivant leur repliement dans l'espace, les protéines peuvent présenter des structures plus ou moins encombrantes, ce qui va ralentir leur progression au sein du gel.
- La taille : Plus une protéine possède de résidus et plus elle est lourde.

Pour répondre aux finalités du western, le gel de migration doit correspondre à un **SDS-PAGE**.

1) SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

Le gel de polyacrylamide est un gel finement réticulé, que l'on fabrique au moment de l'emploi en mélangeant de l'acrylamide qui polymérise en donnant des chaînes linéaires, et du bis-acrylamide qui forme des ponts entre les chaînes quand un agent polymérisant, le persulfate d'ammonium, est ajouté. Le persulfate d'ammonium produit des radicaux libres et ceci plus rapidement en présence de l'activateur TEMED. On obtient ainsi un réseau, dont les mailles sont de taille variable en fonction des proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide utilisées. Le gel obtenu se comporte donc comme un tamis moléculaire : les macromolécules migrent d'autant moins vite qu'elles sont plus grosses. Les gels de polyacrylamide sont des gels de faible porosité qui permettent de séparer la plupart des protéines de 5 à 200 kDa ou des acides nucléiques de 5 à 2000 pb. Le SDS-PAGE contient en plus du sodium dodécylsulfate ou SDS. Ce détergent anionique a deux rôles : - D'une part, il détruit la structure spatiale des protéines, la queue hydrophobe du SDS s'associant aux radicaux hydrophobes des protéines.

- D'autre part, toutes les protéines sont alors chargées de la même façon (négativement), quelques soient leur charge d'origine et avec le même rapport charge / masse. En effet, à saturation, il y a environ 1,4 g de SDS/g de polypeptide, soit en moyenne une molécule de SDS pour 2 acides aminés.

Par conséquent, la séparation électrophorétique en SDS-PAGE est alors uniquement fonction de la masse molaire. Ainsi, l'expérimentateur peut déterminer la masse molaire (MM) des différents polypeptides en se référant à la mobilité de polypeptides de MM connues (marqueurs de MM). Ce gel est dit dénaturant.

2) Western-blot

Les différentes étapes sont les suivantes :

1) Migration et visualisation des protéines totales :

Les protéines totales, extraites de la cellule ou de l'organisme étudié, sont dénaturées en présence de SDS par un chauffage à de 5 minutes à 100°C, puis déposées sur le SDS-PAGE. Après migration, le gel peut être coloré au **bleu de Coomassie** afin de visualiser d'une part la qualité de la migration et d'autre part la quantité de protéines déposées par puits (équivalent de la photo UV du gel de Southern).

2) Transfert :

Après décoloration, le contenu du gel est ensuite directement transféré sur une membrane de nitrocellulose, en utilisant une méthode d'électro-transfert. On applique un champ électrique qui va permettre de détacher les protéines du gel et de les faire passer sur la membrane (celle-ci leur étant imperméable, va les fixer sur la face en contact avec le gel).

3) Détection de la protéine d'intérêt :

L'étape suivante consiste à détecter la protéine d'intérêt sur la membrane en utilisant un **anticorps** dirigé contre elle. En règle générale, il est rarement possible d'utiliser un Ac dirigé contre la protéine étudiée, car ceci nécessite de créer cet Ac, ce qui est souvent laborieux et très cher. C'est pourquoi, les chercheurs ont recours à la stratégie suivante : ils créent *in vitro* une construction permettant d'exprimer leur protéine d'intérêt fusionnée à un motif antigénique (un épitope), reconnu par des Ac commerciaux. On parle de protéine étiquetée. Cette construction est introduite par transgénèse dans l'organisme d'étude et c'est uniquement cette protéine étiquetée qui sera visualisée sur le western.

Classiquement, cette étape de révélation s'effectue en deux temps, avec l'utilisation de deux anticorps différents (voir schéma ci-dessous) :

- En premier, la membrane est mise en contact avec l'**anticorps primaire**, chargé de reconnaître la protéine d'intérêt (soit directement soit via le tag qui lui a été ajouté).

- Après lavage pour éliminer les Ac I non fixés de façon spécifique, un second anticorps est utilisé : l'**anticorps secondaire**. Cet Ac II est dirigé contre les Ac I (si les Ac I ont été obtenu par immunisation d'un lapin, il suffit de les injecter à un rat, qui fabriquera à son tour des Ac anti Anticorps de lapin). Ces Ac II vont jouer deux rôles : - D'une part, ils sont liés (conjugués) à une enzyme donnée, qui sera utilisée pour révéler leur position et par conséquent celle de l'Ac I fixé sur la protéine d'intérêt.

- D'autre part, plusieurs Ac II vont avoir la possibilité de se fixer sur l'Ac I, ce qui permettra d'amplifier le signal et de faciliter sa détection.

3) Révélation :

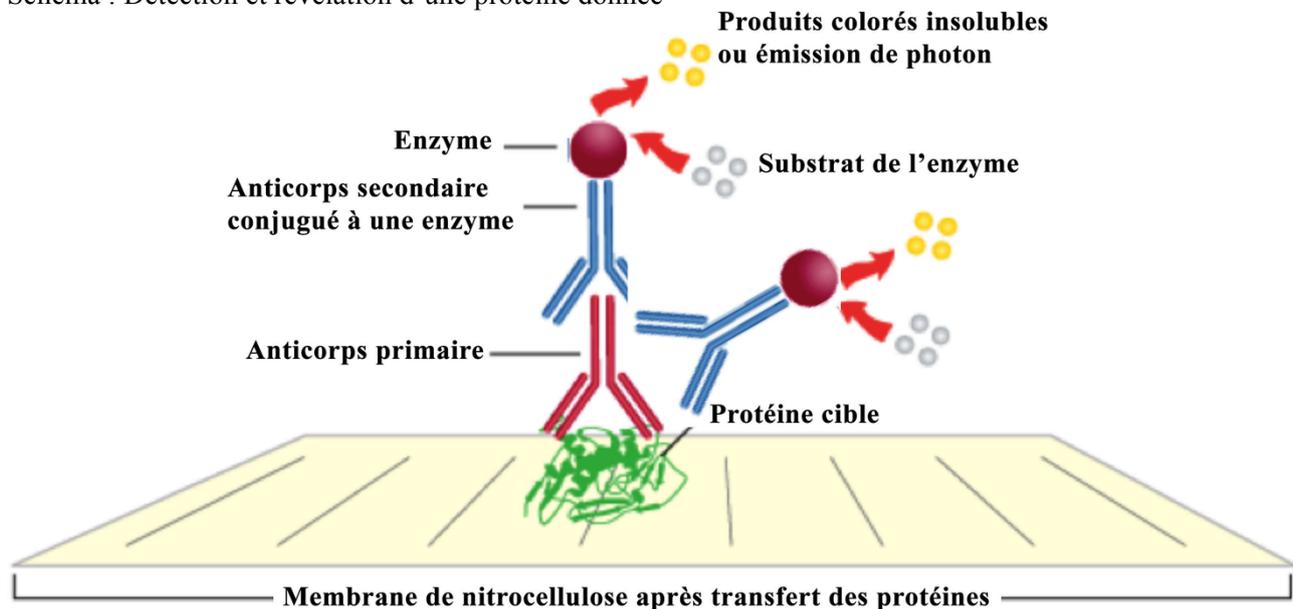
La position de l'Ac II, donc celle de l'Ac I fixé sur la protéine d'intérêt sera révélée grâce à l'enzyme qui lui est conjuguée. Après un second lavage, là encore destiné à éliminer les Ac II fixés de façon non spécifique, les substrats de l'enzyme sont ajoutés dans une solution tampon adéquate afin que la réaction enzymatique se produise.

Deux grands types d'enzyme sont utilisés :

- Soit la réaction aboutit à la libération de photon (cas de la peroxydase du Raifort en présence de luminol). Auquel cas, la révélation de cette activité se fera en utilisant un film autoradiographique.

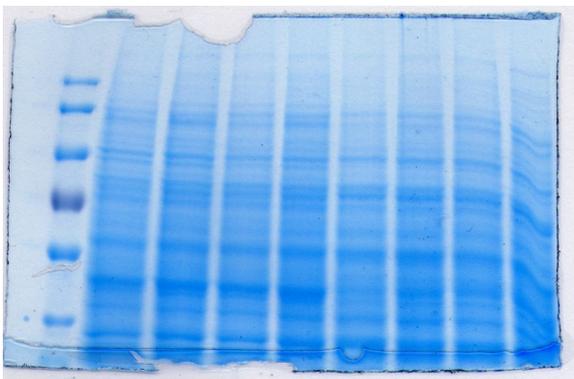
- Soit la réaction aboutit à la production de produits insolubles colorés. Dans ce cas, la coloration apparaît directement sur la membrane (exemple avec la phosphatase alcaline en présence de BCIP et de NBT).

Schéma : Détection et révélation d'une protéine donnée

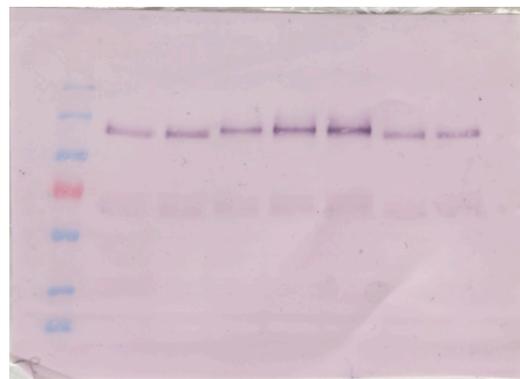


Exemples :

SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie



Membrane après révélation



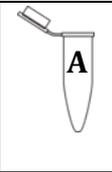
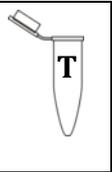
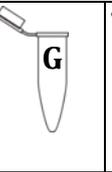
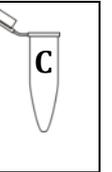
Révélation sur la membrane de la phosphatase alcaline en présence de BCIP et de NBT

Méthode de séquençage de l'ADN : Méthode de Sanger

La méthode de séquençage de Sanger est basée sur l'utilisation des di-désoxyribonucléotides (ddNTP), c'est-à-dire des nucléotides dont le ribose a perdu non seulement le groupement OH en position 2' mais aussi en position 3'. Or si un tel nucléotide est incorporé dans l'ADN au moment de la synthèse, il va aboutir à arrêter cette synthèse, car il ne possède pas de 3'OH permettant la liaison phosphoester avec un nouvel nucléotide entrant.

L'ADN matrice à séquencer est dénaturée par un chauffage à 95°C, puis hybridée à une amorce. **Attention : dans les expériences de séquençage, une seule amorce est utilisée, car on ne peut séquencer qu'un seul brin à la fois.** Puis, la matrice hybridée à l'amorce est répartie dans quatre tubes, contenant tous : l'ADN polymérase (en général le fragment de Klenow de la polI) et les 4 dNTP. Ce qui est différent entre les quatre tubes est la nature du di-désoxyribonucléotide ajouté. Dans le tube A, cela sera du ddATP, dans le C du ddCTP, dans le G du ddGTP et dans le T du ddTTP. Dans ce cas, ce ddNTP est mis en faible quantité, afin qu'il ne soit pas incorporé dès le début de la synthèse. Le but est que dans la population de molécules synthétisées dans le tube, il y ait des molécules arrêtées à chacune des positions possibles pour le ddNTP utilisé.

Mélange réactionnel : (Concernant la détection des produit de synthèse : Voir ci-dessous)

Nom du tube (= base lue)				
Matrice (ADN à séquencer)	+	+	+	+
Amorce (complémentaire de la matrice)	+	+	+	+
Les 4 dNTP (mis en excès)	+	+	+	+
Nature du ddNTP (présent en faible quantité)	ddATP	ddTTP	ddGTP	ddCTP
Tampon (nécessaire pour l'enzyme)	+	+	+	+
ADN polymérase (T7 ADN polymérase)	+	+	+	+

Exemple dans le cas du tube « T » :

Soit la séquence (Matrice en noir) :

3' AATCGGGCATTCCAGTGCTAGTTGACTTGGACTCAGTGGCTTAATC.....5'

Pour effectuer la séquence on utilise l'amorce suivante (indiquée en gris) :

3' AATCGGGCATTCCAGTGCTAGTTGACTTGGACTCAGTGGCTTAATC.....5'

5' TTAGCCCGTAA3'

Si on regarde les différentes molécules obtenues dans le tube T (contenant les ddTTP), on aura :

3' AATCGGGCATTCCAGTGCTAGTTGACTTGGACTCAGTGGCTTAATC.....5'

5' TTAGCCCGTAAAGGTCAGCATCAACTGAACCTGAGTCACCGAATTAG.....3'

5' TTAGCCCGTAAAGGTCAGCATCAACTGAACCTGAGTCACCGAATTd

5' TTAGCCCGTAAAGGTCAGCATCAACTGAACCTGAGTCACCGAATd

5' TTAGCCCGTAAAGGTCAGCATCAACTGAACCTGAGTd

5' TTAGCCCGTAAAGGTCAGCATCAACTGAACCTd

5' TTAGCCCGTAAAGGTCAGCATCAACTd

5' TTAGCCCGTAAAGGTCAGCATd

5' TTAGCCCGTAAAGGTd

Ainsi à chaque position où on trouve un T dans le brin néosynthétisé, il y aura des molécules qui seront arrêtées dans leur élongation par l'incorporation d'un ddTMP. Et sur l'ensemble de la population, toutes les positions de T seront ainsi identifiées. Il en va de même pour les A dans le tube contenant les ddATP, les C avec les ddCTP et les G avec les ddGTP.

Avant de déposer les produits de la réaction sur le gel, on chauffe de nouveau les échantillons afin de dénaturer les molécules d'ADN, le but étant ici de séparer la matrice du brin néosynthétisé, car seule la taille de celui-ci est importante. La migration électrophorétique est ensuite réalisée sur un gel de polyacrylamide contenant de l'urée en grande quantité ; il s'agit en fait d'un gel dénaturant, car il est important d'empêcher la formation de structure secondaire au niveau des ADNs simple brin. En effet, celles-ci modifieraient leur distance de migration. On utilise un gel de polyacrylamide, et non un gel d'agarose, car il est beaucoup plus résolutif, permettant de séparer deux molécules qui diffèrent simplement par un nucléotide.

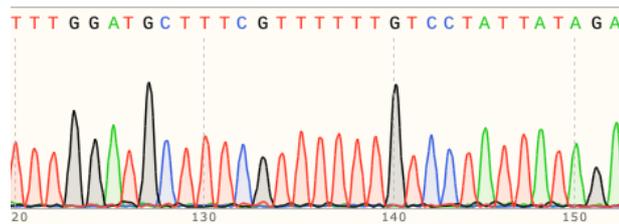
Trois méthodes sont possibles pour visualiser les molécules néosynthétisées au sein du gel :

- Soit en utilisant un des 4 dNTP porteur d'un atome radioactif (en général, de l' α - ^{32}P dNTP), afin de marquer le brin néosynthétisé. Dans ce cas la révélation s'effectue via un film autoradiographique.

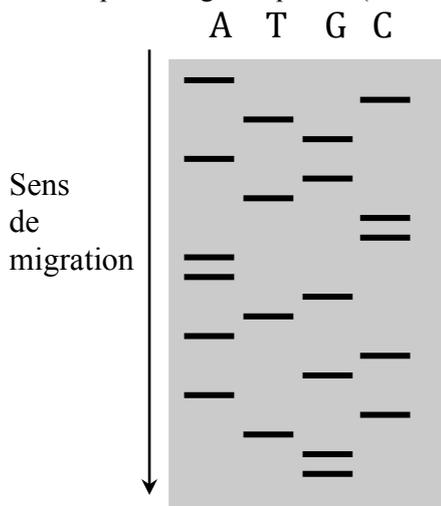
- Soit en utilisant une amorce porteuse au niveau 5' d'un traceur fluorescent.

Une troisième technique (abondamment utilisée de nos jours) consiste à marquer chaque di-désoxyribonucléotide par un fluorochrome de couleur différent. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de faire 4 mélanges réactionnels, un seul suffit contenant les 4 ddNTP en plus des 4 dNTP. La différence se fera à la lecture du fluorochrome, qui indiquera si le ddNTP incorporé est soit du ddAMP, soit du ddCMP, soit du ddTMP ou soit du ddGMP, la lecture se faisant via un laser.

Exemple d'une séquence « moderne » :
Normalement les A sont en vert, les T en rouge, les C en bleu et les G en noir



Exemple d'un gel séquence (old school):



Un gel de séquence se lit du bas vers le haut, c'est-à-dire des petits poids moléculaires vers les grands. Ce qui donne la séquence du brin néosynthétisé du 5' vers le 3'.

La séquence de ce fragment est donc :
5' GGTCAGCATGAACCTGAGTCA 3'

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Une réaction de PCR permet d'amplifier un fragment d'ADN très précis. Elle est réalisée en utilisant une enzyme polymérase particulière : une Taq polymérase. Il s'agit d'une polymérase extraite d'une bactérie thermophile : *Thermus aquaticus*. Cette bactérie vit à des températures très hautes. Par conséquent son enzyme est thermostable, et est capable de résister à des températures avoisinant les 100°C, sa température optimale de fonctionnement étant aux alentours de 68 à 72°C. Néanmoins, elle fonctionne comme toute polymérase, c'est-à-dire qu'elle crée des liaisons phosphoester entre le groupement PO₄ en position 5' α d'un désoxyribonucléotide triphosphate avec le 3'OH d'une amorce, le tout en lisant un brin matrice. Autrement dit, il faut que la séquence entourant le gène d'intérêt soit préalablement connue et ceci afin de pouvoir synthétiser des oligonucléotides qui vont donc servir d'amorce. Il faut donc deux amorces, situées de part et d'autre de la zone à amplifier (autrement dit complémentaires des séquences localisées de part et d'autre de cette région), et orientées de façon bien particulière : leurs extrémités 3'OH doivent se faire face.

Mélange réactionnel :

L'ADN matrice est mélangé avec l'enzyme Taq polymérase, en présence des 4 dNTP, des deux amorces, le tout dans un tampon adéquat pour un fonctionnement optimal de l'enzyme.

Déroulement de la réaction :

La réaction de PCR correspond à un enchaînement de cycle. Chaque cycle est divisé en trois étapes:

> Étape 1 : Dénaturation de la matrice ADN.

L'ADN génomique est chauffé à 94-95°C, afin d'être dénaturé, c'est-à-dire séparation des deux brins.

> Étape 2 : Hybridation des amorces.

Les deux amorces contenues dans le mélange réactionnel vont s'hybrider au niveau des séquences complémentaires, situées de part et d'autre de la zone à amplifier. Pour ce faire la température est abaissée. En général, cette température est de l'ordre de 50 à 65 °C, elle est choisie en fonction de la taille des amorces et de leur pourcentage en GC (plus celui-ci est fort et plus la température sera haute).

> Étape 3 : Extension.

La température est remontée au niveau de la température optimale de la Taq, soit entre 68 et 72°C. Celle-ci va donc se fixer sur les 3'OH des amorces et va synthétiser le brin complémentaire de chaque brin matrice. Puis le cycle est recommencé plusieurs dizaines de fois.

Il va sans dire que cette technique n'est possible que grâce à la thermorésistance de la Taq polymérase, qui lui permet sans difficulté de résister aux températures nécessaires à la dénaturation de la matrice, ainsi qu'à celles utilisées lors de l'hybridation des amorces.

À la fin des cycles, l'ADN amplifié correspond à la séquence comprise entre les deux amorces.

Voir schéma.

Quantité de matériel amplifié :

Une fois apparu (à partir du second cycle), l'amplicon est amplifié de façon exponentielle, sa quantité doublant à chaque cycle.

Ainsi en théorie, la quantité maximale de l'amplicon sera de $Q_{\max} = Q_0 \times 2^{n-1}$

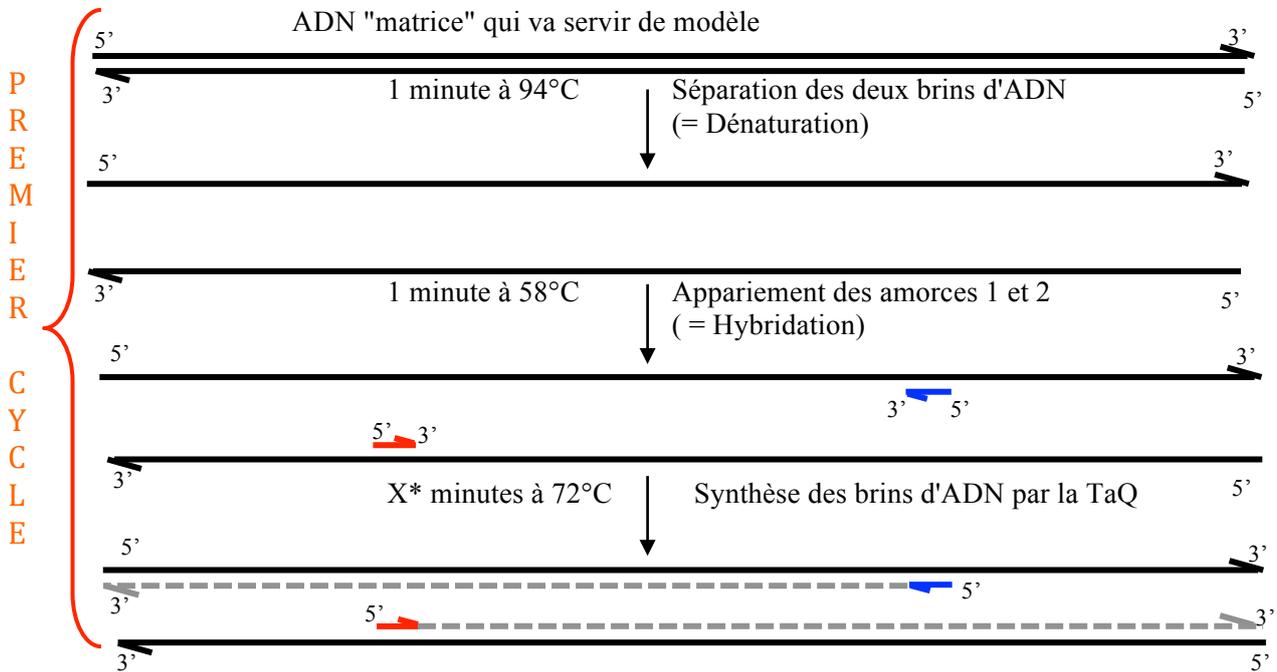
Mais en réalité, du fait de l'inactivation progressive de la Taq au cours des cycles, cette quantité sera de :

$$Q = Q_0 \times (1+E)^{n-1}$$

Avec : Q₀ = Quantité initiale de matrice, n = nombre de cycle, E = Efficacité de la réaction : 0 < E < 1

Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR

Au cours du premier cycle



* On compte en général un temps de 1 min par kiloBases (1000pb)

Au cours du second cycle

Les deux types de molécules d'ADN, c'est-à-dire les molécules parentales (en noir) et les nouvelles molécules (en gris pointillé) vont être répliquées, servant de matrice à la Taq polymérase.

Pour les molécules parentales voir le schéma ci-dessus.

Pour les nouvelles molécules, on obtient à la fin du cycle de PCR :



Au cours du troisième cycle

Les trois types de molécules d'ADN, c'est-à-dire les molécules parentales (en noir) et les deux types de nouvelles molécules (en pointillé gris ou noir) vont être répliquées.

Pour les molécules parentales voir le premier cycle ci-dessus.

Pour les nouvelles molécules en pointillé gris, voir le second cycle.

Pour les nouvelles molécules en pointillé noir, on obtient à la fin du cycle de PCR :



A la fin des 20-40 cycles de PCR

La majorité des fragments d'ADN correspondent au fragment situé entre les deux amorces :



À partir du troisième cycle, la quantité de cet amplicon augmente de façon exponentielle, étant doublé à chaque cycle.

Cartographie des ARNm

(Détermination de la position des extrémités 5', 3' et des introns)

Remarque : Les trois techniques présentées ci-dessous nécessitent en prérequis une analyse bio-informatique de la séquence obtenue sur l'ADN génomique, afin de choisir correctement les sondes ou les oligonucléotides adéquates.

1) Cartographie à la nucléase S1

Il s'agit de la technique de la **cartographie à la nucléase S1**.

La nucléase S1 est une endonucléase dont le substrat correspond à un acide nucléique **simple brin** (ADN ou ARN), qui va être coupé en petit fragment.

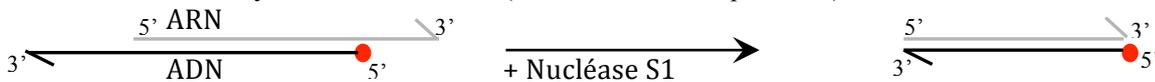
Le principe de la cartographie à la nucléase S1 est le suivant :

- 1) Marquage en extrémité 5' du fragment d'ADN génomique contenant la séquence d'intérêt.
- 2) Mélange de cet ADN dénaturé avec l'ARN total cellulaire, dans des conditions où l'on favorise la formation d'hybride ADN-ARN. Des deux simples brins radioactifs sur notre ADN sonde, un seul va s'hybrider à l'ARNm correspondant (le brin qui lui sera complémentaire).
- 3) Puis on fait agir la nucléase S1 : elle va digérer toutes les molécules ou toutes les portions des molécules d'ADN et/ou d'ARN qui sont restées non appariées, donc simple brin.
- 4) Le produit de la digestion est chauffé à 95°C, puis est déposé sur un gel de polyacrylamide dénaturant (un gel séquence) et soumis à une électrophorèse. En parallèle, on dépose sur le même gel une réaction de séquence, qui va servir d'échelle afin d'estimer la taille du fragment non digéré. Ou bien, on peut également déterminer la séquence du fragment obtenu.
- 5) On effectue une autoradiographie afin de révéler le résultat.

Schéma :

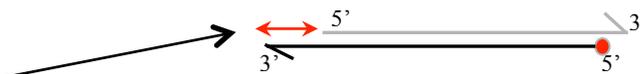
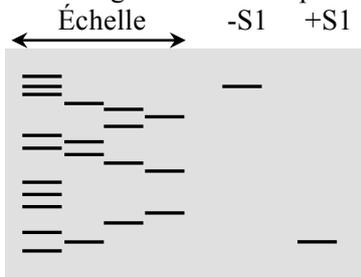
Cas où il n'y a pas d'intron (détermination du +1 de transcription) :

Formation d'un hybride ADN-ARNm (L'ADN étant marqué en 5')



Action de la nucléase S1 qui élimine tout ce qui est simple brin.

Dépôt sur un gel dénaturant après chauffage 5min à 95°C et autoradiographie :



La différence de taille entre les deux bandes donne la position du début du messager.

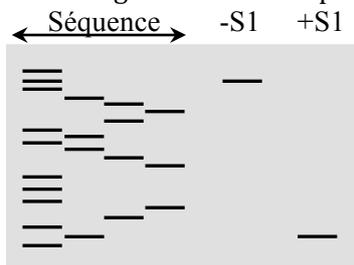
Cas avec intron :

Formation d'un hybride ADN-ARNm

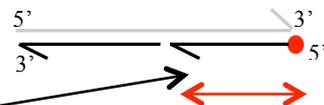


Ce fragment ne sera pas détecté sur l'autoradiographie car non marqué.

Dépôt sur un gel dénaturant après chauffage 5min à 95°C et autoradiographie :



La taille du fragment protégé donne la position de l'intron par rapport à l'extrémité 5' de la sonde ADN

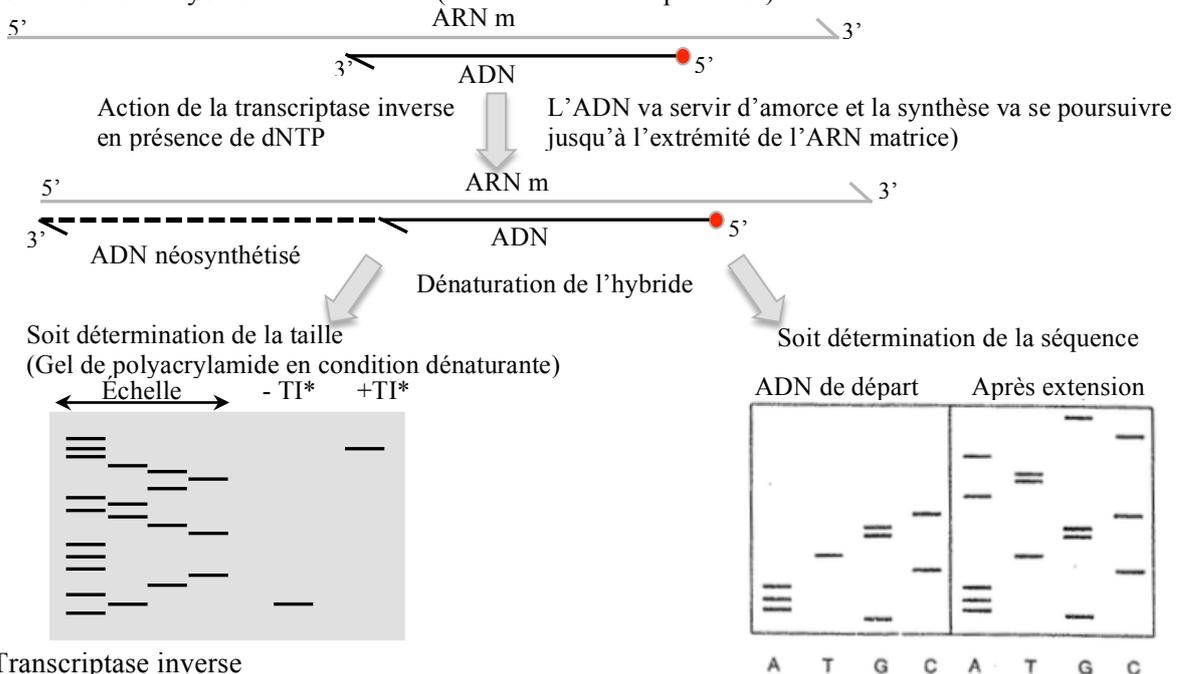


2) Extension d'amorce

Le principe est le suivant : on utilise un ADN marqué en extrémité 5', complémentaire à l'ARNm d'intérêt et de séquence connue. Cet ADN, qui peut correspondre soit à un fragment de restriction soit à un oligonucléotide, va servir d'amorce pour la transcriptase inverse. Par conséquent, par rapport à la technique de cartographie à la nucléase S1, le début de l'expérience est identique : avec le marquage en extrémité 5' de l'ADN amorce, suivi de l'hybridation de cet ADN sonde dénaturé sur l'ARN total. Seul un détail diffère par rapport à la nucléase S1 : ici, l'ADN marqué doit être choisi de telle manière à ce qu'il soit plus court que l'ARN avec lequel il sera hybridé (c'est l'inverse dans la première technique). En effet, dans ce type d'expérience, c'est l'extrémité 5' de l'ARN qui doit rester sous forme simple brin et non plus celle de l'ADN. L'ADN hybridé va alors servir d'amorce pour la transcriptase inverse qui va copier sous forme d'ADNc la partie de l'ARN non hybridé avec l'ADN sonde. L'hybride sera ensuite dénaturé, puis sa taille ou bien sa séquence sera déterminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide, comme pour l'expérience de cartographie à la nucléase S1. Les résultats obtenus avec ces deux techniques sont identiques.

Schéma : (Ici détermination de l'extrémité 5')

Formation d'un hybride ADN-ARNm (L'ADN étant marqué en 5')



* TI = Transcriptase inverse

3) RT-PCR (Reverse transcriptase PCR), 5' et 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends).

La RT-PCR consiste dans un premier temps à créer un pool d'ADNc à partir de la totalité des ARNm présents dans l'extrait. Pour ce faire, on fait agir une transcriptase inverse en présence de dNTP. Puis, les ADNc sont ensuite utilisés comme matrice lors d'une réaction de PCR. À noter, que certaines Taq polymérase, en présence d'ions manganèse, peuvent présenter une activité transcriptase inverse *in vitro*, ce qui permet de réaliser les deux étapes dans le même tube. Le couple d'amorce utilisé dépend du but de l'expérience.

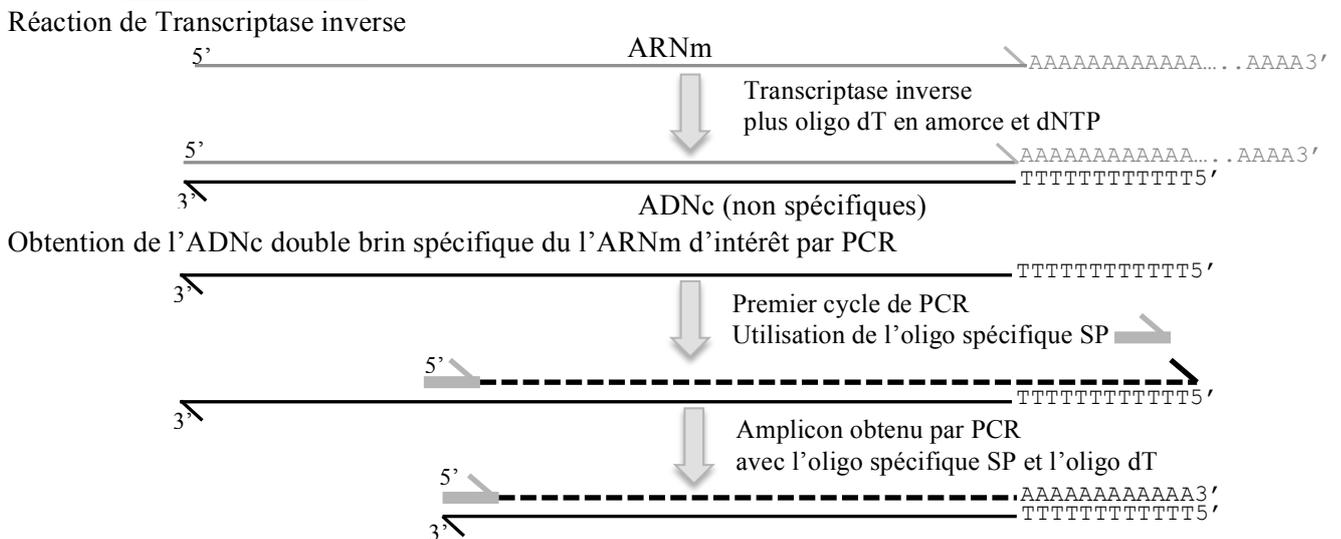
- **Cas du 3'RACE** : Identification de l'extrémité 3' de l'ARNm.

La réaction de transcriptase inverse est réalisée en utilisant comme amorce un oligonucléotide poly(dT), qui va s'hybrider sur les ARNm au niveau de la queue de polyA (cette technique s'adresse donc aux ARNm eucaryotes). À la suite de cette réaction, c'est la totalité des ARNm polyadénylés présents dans l'extrait qui sera transformée en ADNc simple brin. Ces ADNc sont alors utilisés en tant que matrice lors d'une réaction de PCR. Le couple d'amorce est constitué d'une part par l'oligo poly(dT) et d'autre part, par un oligonucléotide, spécifique (noté SP) de l'ARNm d'intérêt, et complémentaire de l'ADNc (donc ayant la même séquence que l'ARNm). Lors de la première étape de PCR, l'oligo spécifique (SP) va permettre la synthèse du brin complémentaire de l'ADNc afin d'obtenir un ADN duplex, qui servira de matrice lors de la PCR, réalisée de façon classique. Après amplification, le ou les produits sont séquencés afin d'identifier la région 3' de l'ARNm (Voir Schéma).

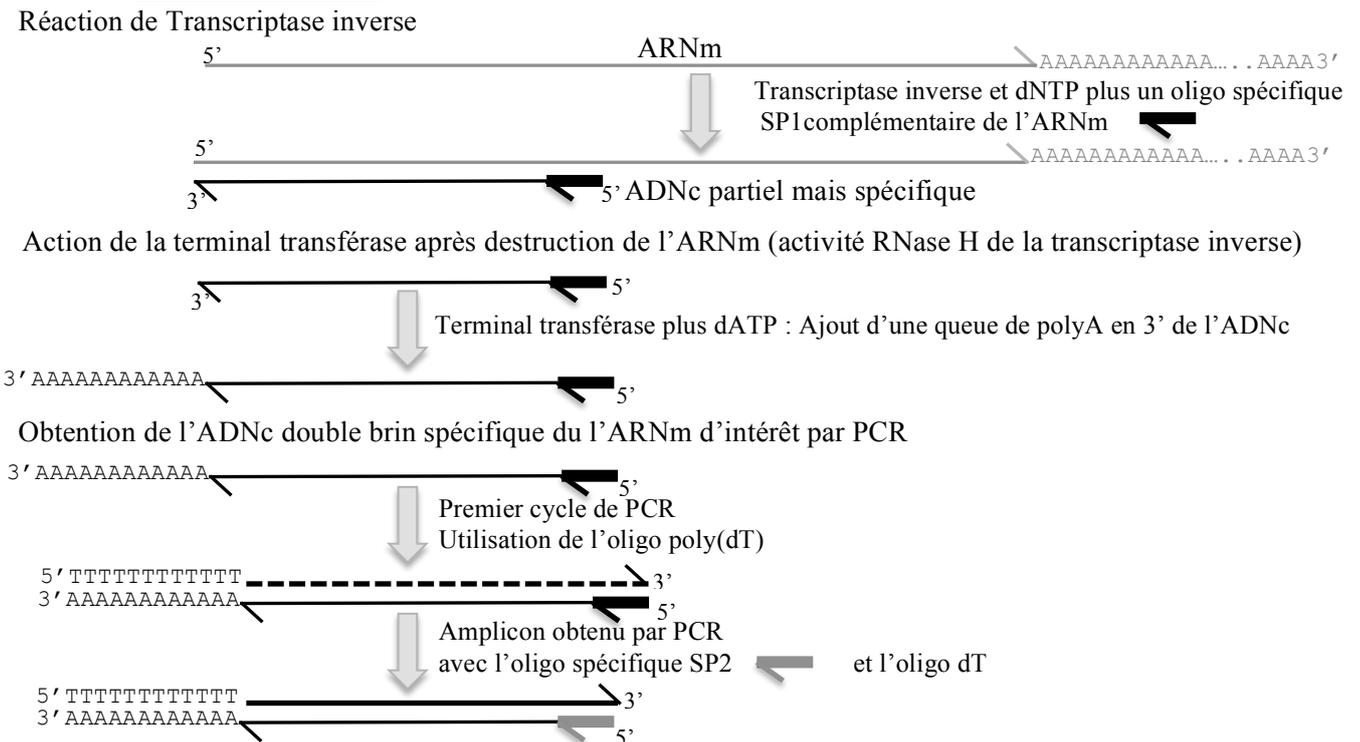
- Cas du 5'RACE : Identification de l'extrémité 5' de l'ARNm.

La détermination de l'extrémité 5' de l'ARNm est un peu plus complexe que celle du 3' et fait appel à une activité enzymatique supplémentaire. La réaction de transcriptase inverse est réalisée en utilisant comme amorce un oligonucléotide spécifique interne à l'ARNm d'intérêt (et donc complémentaire à cet ARNm – noté SP1). À la suite de cette réaction, contrairement au 3'RACE, une seule espèce d'ARNm sera transformée en ADNc simple brin, celle qui correspond à notre ARNm d'intérêt. Cet ADNc est soumis à la **terminal transférase** en présence de dATP, qui ajoute une queue de polydA au niveau du 3' de l'ADNc simple brin (rappel : le 3' de l'ADNc est le complémentaire du 5' de notre ARNm !). Cet ADNc polyadénylé est alors utilisé en tant que matrice lors d'une réaction de PCR. Le couple d'amorce est constitué d'une part par l'oligo poly(dT) et d'autre part, par un oligonucléotide, spécifique (noté SP2) de l'ARNm d'intérêt, et complémentaire de l'ARNm (donc ayant la même séquence que l'ADNc). En règle générale, cet oligo SP2 n'est pas totalement identique avec l'oligo SP1, étant partiellement chevauchant, pour augmenter la spécificité de l'amplification. Lors de la première étape de PCR, l'oligo poly(dT) va permettre la synthèse du brin complémentaire de l'ADNc afin d'obtenir un duplex. La suite est identique au 3'RACE (Voir Schéma).

Schéma : Cas du 3'RACE



Cas du 5'RACE



- Cas des introns :

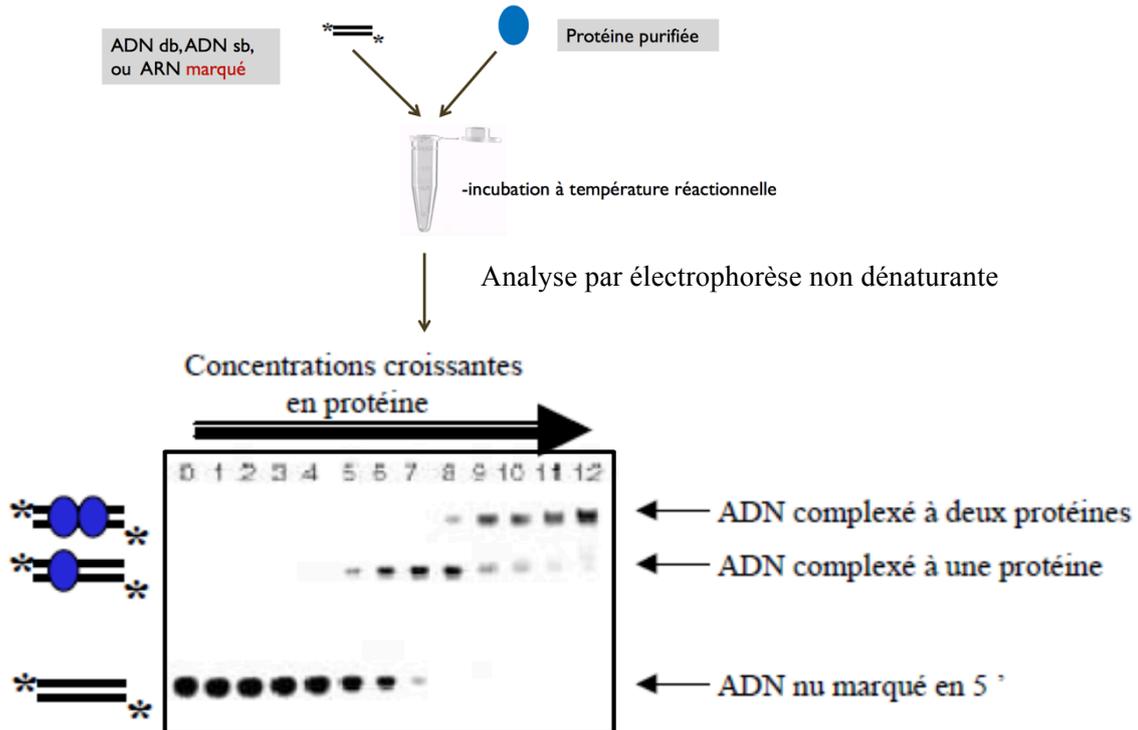
La séquence des amplicons issus des expériences de 5' et 3' RACE peut permettre de positionner les introns, par comparaison avec la séquence de l'ADN génomique.

Il est également possible d'effectuer une RT-PCR, en utilisant à chaque étape des oligonucléotides spécifiques (pas d'oligo(dT)), permettant d'amplifier un ADNc partiel. Il suffit de choisir ces oligonucléotides spécifiques de l'ARN ciblé.

Technique d'étude des interactions ADN-protéines

1) Expérience de retard sur gel (dit EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay)

L'EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), ainsi que son dérivé le REMSA (*RNA electromobility shift assay*), est une technique simple pour étudier une interaction entre un acide nucléique et des protéines. Elle repose sur le fait qu'un complexe ADN-protéine ou ARN-protéine migrera moins vite dans un gel non-dénaturant qu'un ADN ou un ARN nu. Ce retard de migration permet de juger au premier coup d'œil si une séquence particulière d'ADN ou d'ARN a été reconnue et liée par une protéine. L'illustration présente le cas de deux sites portés sur un même fragment. Si les deux sites fixent la même protéine, l'apparition du second complexe sera fonction de la concentration en protéine dans la réaction. L'acide nucléique est marqué radioactivement à son extrémité 5'.



La spécificité de l'interaction acide nucléique-protéine peut être vérifiée par des expériences dites de « compétition ». Il s'agit d'ajouter, dans deux expériences indépendantes, en plus de l'acide nucléique marqué et de la protéine d'intérêt :

- un excès de la même molécule d'acide nucléique mais non radioactive ;
- un excès d'une autre molécule d'acide nucléique non radioactive.

L'expérience a) constitue le contrôle positif de la compétition : la version non marquée étant en excès, la protéine va statistiquement se fixer plutôt sur elle (au détriment de la version marquée dont la migration ne sera alors plus retardée). *N.B. : Bien sûr, la migration de la version non marquée sera alors retardée, mais cela ne se verra pas puisque la révélation se fait par autoradiographie et ne permet donc pas de visualiser les molécules non radioactives.*

L'expérience b) est celle qui permet de conclure véritablement à la spécificité ou non de fixation de la protéine d'intérêt sur l'acide nucléique étudié :

- si cette fixation est non spécifique (la protéine se fixe sur n'importe quel acide nucléique, et ceci quelque soit la séquence), il se produira le même phénomène qu'en a) (c'est-à-dire disparition de la bande correspondant à la migration retardée de l'acide nucléique d'intérêt) ;
- si cette fixation est spécifique (la séquence du fragment a de l'importance), l'excès d'acide nucléique quelconque non marqué ne changera en rien le profil de migration (la migration de l'acide nucléique d'intérêt marqué sera toujours retardée), car la protéine ne se fixera pas sur le compétiteur.

L'interaction Acide nucléique-protéine peut être également testée en incubant le(s) complexe(s) formé(s) avec un anticorps reconnaissant la protéine, puis en déposant sur un gel non dénaturant les produits générés. Le complexe ternaire ADN-protéine-anticorps a une migration encore plus retardée, qu'on qualifie de

supershift. Cette technique est particulièrement adaptée lorsque les protéines ne sont pas purifiées (i.e. extraits nucléaires) afin de vérifier que les complexes observés sont bien spécifiques. Dans le cas de complexes faisant intervenir plusieurs protéines, le supershift permettra d'identifier dans quels complexes sont impliqués les différents partenaires.

2) Expérience d'empreinte

Cette expérience permet visualiser sur l'acide nucléique, le zone de contact avec la protéine. Elle nécessite dans un premier temps l'obtention d'une molécule d'acide nucléique porteuse d'un marquage radioactif **mais sur un seul de ces deux brins**. Le résultat de l'expérience d'empreinte ne sera valable que pour le brin marqué. Il faudra faire une autre expérience avec un marquage sur l'autre brin pour visualiser l'empreinte de la protéine.

- 1) Obtention d'une molécule d'ADN marqué sur un seul brin :

La première étape consiste à faire le marquage d'un fragment d'ADN (en général double brin) aux extrémités 5' (indiqué par ●) (cf la technique de marquage avec action de la PNK sur un ADN déphosphorylé), puis on fait agir une enzyme de restriction (qui ne coupe pas au milieu du fragment). On récupère alors un des deux fragments : celui-ci possédera une seule extrémité 5' porteur d'un atome radioactif.

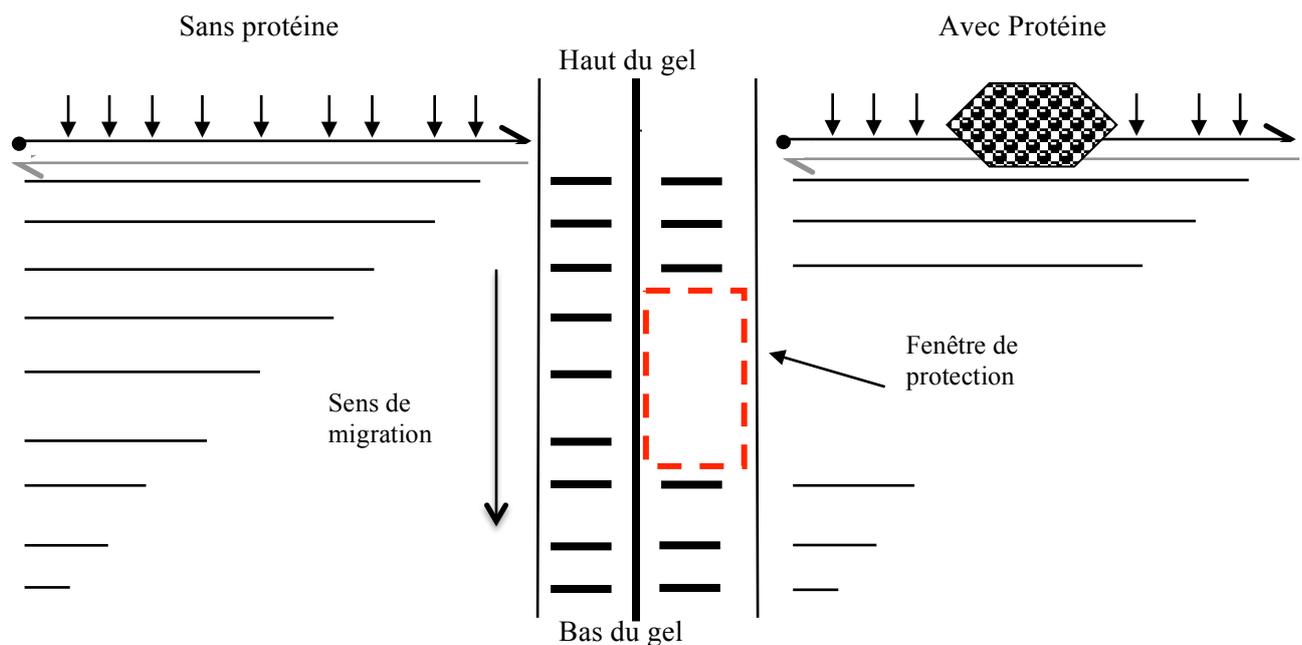
- 2) Réalisation de l'empreinte :

La quantité de fragment obtenu est séparée en deux lots : un des deux lots est incubé avec la protéine d'intérêt et l'autre est incubé en son absence. Puis les deux lots sont mis en présence de DNase I. La DNase I coupe les liaisons phosphoester à l'intérieur d'une molécule d'ADN, et ceci de façon aléatoire (avec néanmoins des sites préférentiels après des nucléotides pyrimidiques). Le point important ici est que la réaction de digestion par la DNase I est réalisée **dans des conditions ménagées de façon à ce qu'une seule coupure soit introduite par molécule d'ADN**. Mais sur l'ensemble des molécules présentes dans la réaction, TOUS les sites potentiels seront digérés. Les produits de digestion sont séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant et une autoradiographie est réalisée. Donc seules les molécules porteuses du marquage en 5' seront révélées. La présence de la protéine sur l'ADN rend les sites inaccessibles à la DNase I. Cette protection va se traduire par un espace vide sans bandes (« trou ») sur l'autoradiographie du gel.

Schéma :

Ici on a marqué le brin supérieur, donc c'est celui-ci, qui va être révélé (l'autre n'est pas étudié au cours de cette manip, il faudra en effectuer une seconde avec le marquage uniquement de l'autre brin).

Attention sur ce schéma, seules les molécules visibles sur l'autoradiogramme ont été schématisées !



Les flèches verticales indiquent les sites de coupures de la DNase I.

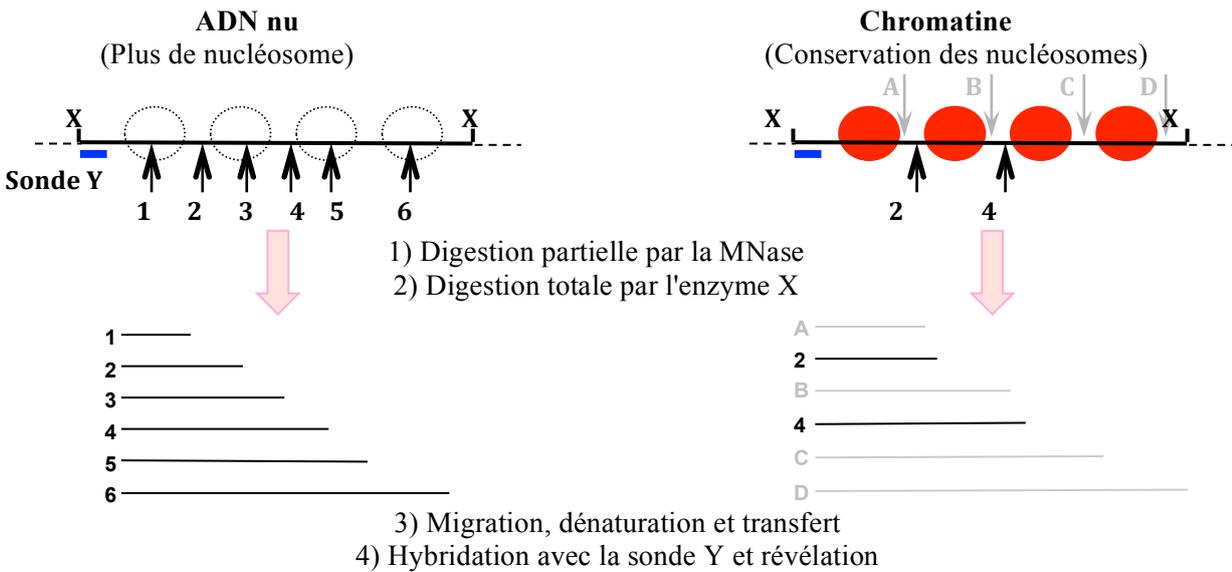
L'action de cette enzyme sur le brin non marqué n'a pas été schématisée car les produits de digestion ne seront pas visibles sur l'autoradiogramme.

Analyse de la structure de la chromatine

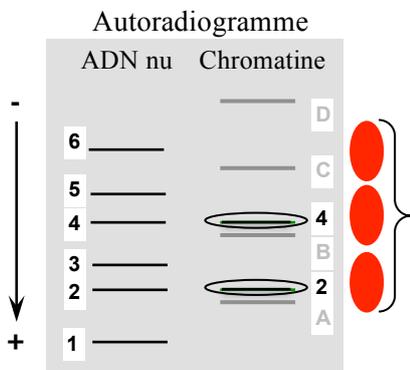
1) Positionnement des nucléosomes : méthode de la Protection à la MNase

Après une extraction douce de la chromatine afin de respecter sa structure, on fait effectuer une **digestion partielle par la MNase**. Cette enzyme va couper l'ADN sur les deux brins entre les nucléosomes, car ces régions constituent des sites hypersensibles, en raison de leur présentation et accessibilité particulière. Puis, on fait subir à ce mélange réactionnel un traitement au phénol de façon à éliminer non seulement la MNase, mais également les histones : il y a donc perte de la structure de la chromatine, par conséquent on va ensuite travailler sur l'ADN seul. Les fragments d'ADN ainsi obtenus sont ensuite soumis à une digestion totale par une enzyme de restriction qui coupe de part et d'autre de la région analysée (sur le schéma : il s'agit de l'enzyme X) afin de limiter la région étudiée. Cette digestion est déposée sur un gel d'agarose, soumise à une migration électrophorétique, puis le gel est traité comme lors d'une expérience de Southern-blot. La sonde utilisée (fragment Y sur le schéma) est un petit fragment situé à une extrémité de la région analysée. Lors de l'analyse, on compare le profil d'hybridation obtenu avec celui réalisé sur un ADN débarrassé de ces nucléosomes avant le traitement à la MNase, et dit : **ADN nu**. Sur cet ADN nu, la MNase effectue des coupures au niveau de régions riches en AT, différentes en général des sites hypersensibles présents entre les nucléosomes. Au niveau de la chromatine, ces sites, présents sur l'ADN nu, peuvent être inaccessibles en raison de la présence des nucléosomes et par conséquent ne seront pas digérés sur la chromatine. Par contre, ceux entre les nucléosomes pourront être toujours accessibles et donc digérés. La comparaison des deux profils permet alors de positionner les nucléosomes.

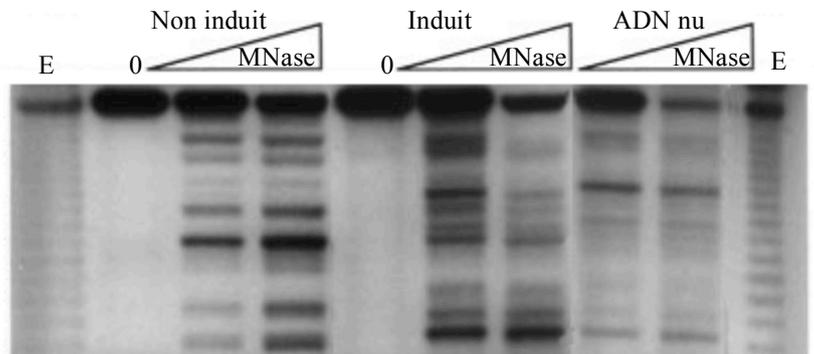
Schéma :



Théorie



Réalité : Cas de la région entre les gènes *niiA* et *niaD*



↑ : Site de coupure sur l'ADN nu pour la MNase ↓ : Site hypersensible à la MNase ● Nucléosomes

○ Bandes présentes dans le profil de l'ADN nu, donc correspondent à des sites de coupures qui existent aussi sur l'ADN nu, et non à des sites hypersensibles entre les nucléosomes.

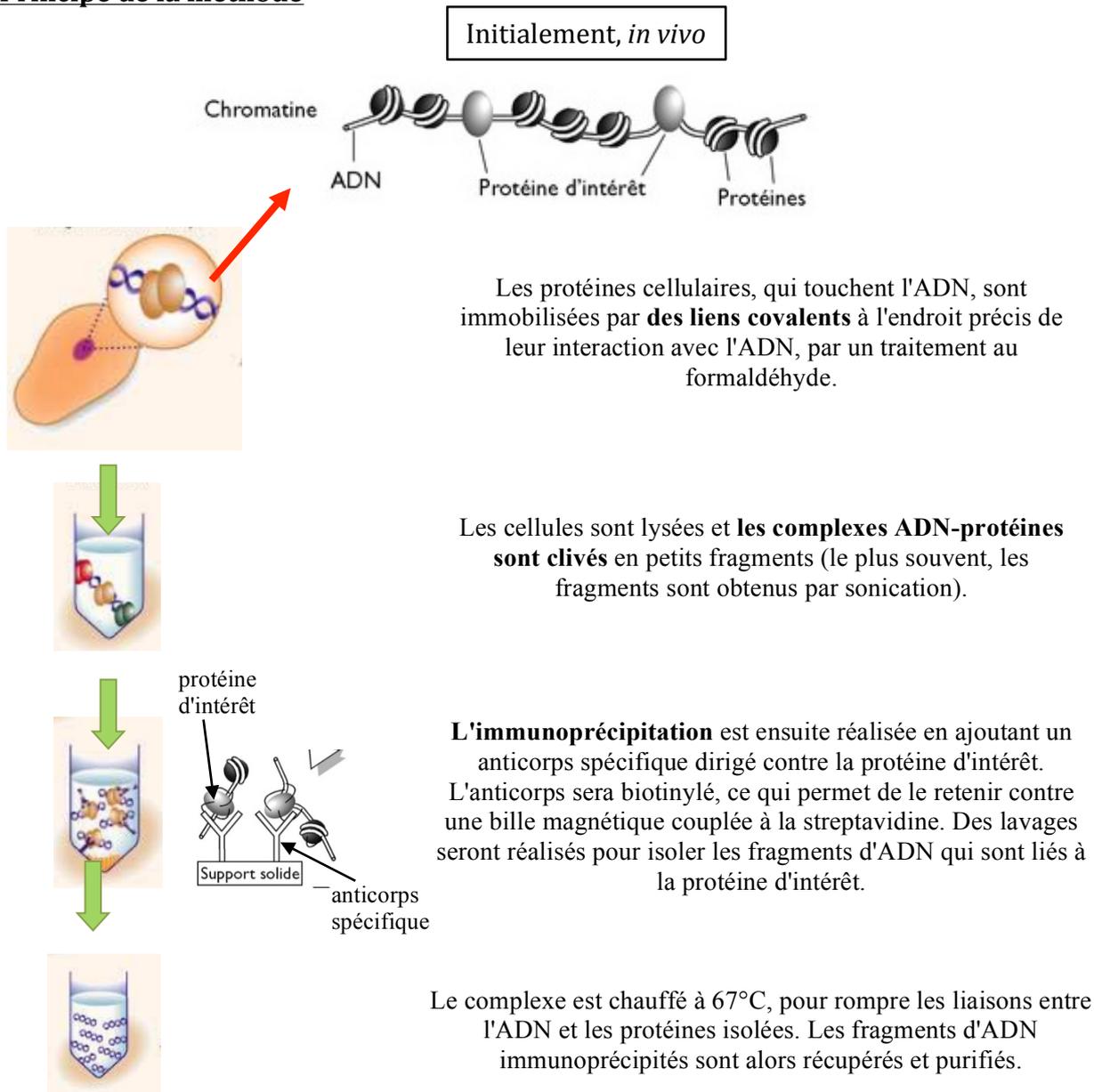
▴ Quantité croissante de MNase de 1 à 25 U

E : échelle de taille

2) Chromatin Immunoprecipitation ChIP

Le "ChIP" (*Chromatin Immunoprecipitation* = Immunoprécipitation de la chromatine) est une technique expérimentale permettant d'analyser **les interactions entre l'ADN et les protéines** dans la cellule. Elle est utilisée pour identifier les sites de liaison de l'ADN sur le génome pour une protéine d'intérêt (comme par exemple les facteurs de transcription et leurs promoteurs). L'avantage de cette technique est qu'elle s'effectue *in vivo*, c'est à dire sur des cellules vivantes. Cette technique consiste à **purifier des complexes ADN-protéines**, formés *in vivo* et liés de façon covalente par du formaldéhyde (le formaldéhyde est un agent de liaison qui permet de produire un lien *in vivo* à la fois "acides nucléiques-protéines" et "protéines-protéines").

Principe de la méthode



L'ADN peut ensuite être analysé par des techniques conventionnelles comme l'analyse par PCR, le Southern blot, le séquençage (avec le séquençage à haut débit, on parle de "ChIP-Seq") et l'hybridation sur puce ("ChIP on chip" qui permet de déterminer la présence de la protéine d'intérêt dans le génome entier).

Techniques diverses

1) Centrifugation en gradient de densité (zonale ou bien à l'équilibre)

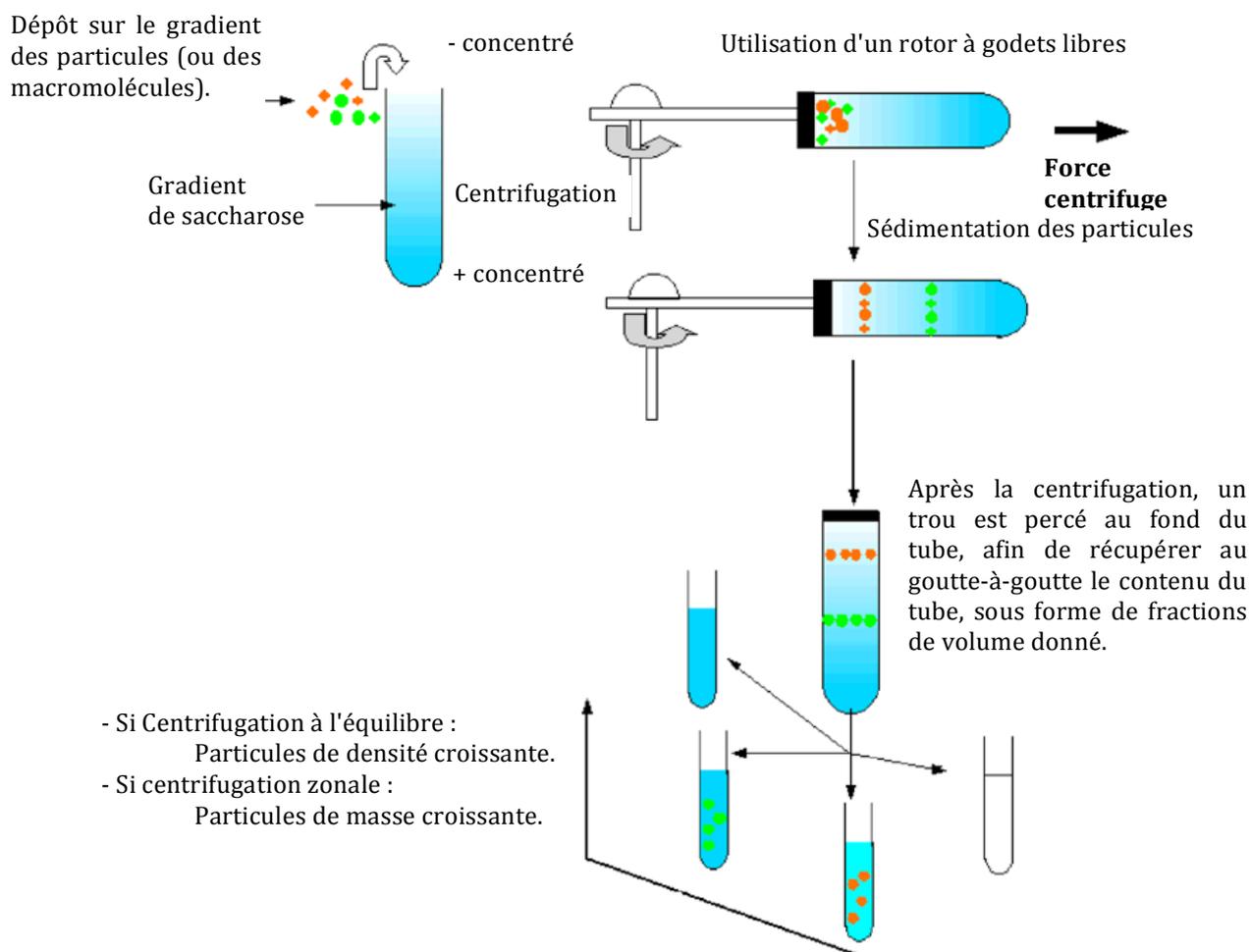
Une centrifugation en gradient de densité s'effectue en déposant les macromolécules ou les particules dans un tube à la surface d'un gradient. Différents composés peuvent être utilisés pour établir un gradient, comme par exemple le saccharose. Un gradient de saccharose est obtenu en superposant des solutions de concentration de plus en plus faible donc de densités différentes, permettant de créer des gradients discontinus. Des gradients continus, où la variation de densité est graduelle, peuvent également être obtenus. Le but de ce gradient est de moduler la vitesse de sédimentation des particules en jouant sur la différence de leur densité avec celle du solvant.

On distingue deux types de centrifugation en gradient de densité :

- **La centrifugation à l'équilibre** : Elle permet de séparer les particules en fonction de leur densité. Au cours de cette centrifugation, les particules vont migrer dans le tube, sous l'influence de la force centrifuge, jusqu'à la région du gradient où la densité sera égale à la leur. Une fois que cette zone est atteinte, les particules n'en bougeront plus, même si la centrifugation est poursuivie. D'où le terme de centrifugation à l'équilibre.

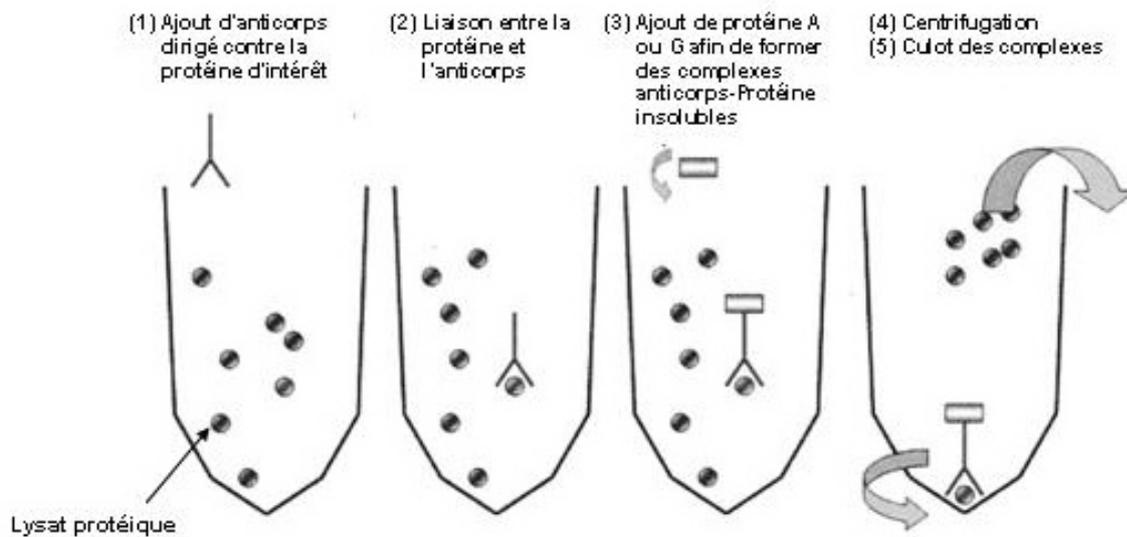
- **La centrifugation zonale** : Elle consiste à séparer les particules ou les molécules en fonction de leur masse (ici la densité n'intervient que très faiblement). La différence par rapport à la centrifugation à l'équilibre est que la concentration maximale du gradient est moins dense que celle des particules. Le gradient sert, dans ce cas, à accélérer la sédimentation des particules lourdes par rapport à celles plus légères, sans toutefois leur permettre de tomber au fond du tube. Il ne s'agit pas d'atteindre l'équilibre, et par conséquent la centrifugation est arrêtée quand les particules sont suffisamment séparées.

Dans les deux cas, le traitement est assez similaire :



2) Immunoprécipitation

Cette technique d'immunoprécipitation permet d'isoler une protéine donnée dans une solution protéique à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt. Les complexes anticorps/antigène sont précipités à l'aide de billes d'agarose complexées à la protéine A ou G. Cette protéine A ou G va reconnaître les anticorps présents dans la solution et va se complexer avec eux. Il s'agit en fait de protéines qui se trouvent naturellement à la surface de certaines bactéries infectieuses (*Staphylococcus* pour la A et *Streptococcus* pour la G). Ces protéines sont alors chargées de lier les immunoglobulines de l'hôte d'une façon différente par rapport à une réaction Ac-Ag, faisant que les Ig ne les présentent plus correctement vis-à-vis des phagocytes. Cette capacité à lier les Ac est utilisée ici lors d'une expérience d'immunoprécipitation. Ces complexes protéines A ou G-Ac étant insolubles, vont alors précipiter. Pour récupérer le précipité, il suffit de centrifuger l'échantillon, ce qui permet de faire culotter les complexes.



Après précipitation et lavages, les complexes sont séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et la protéine d'intérêt peut être visualisée par western-blot.

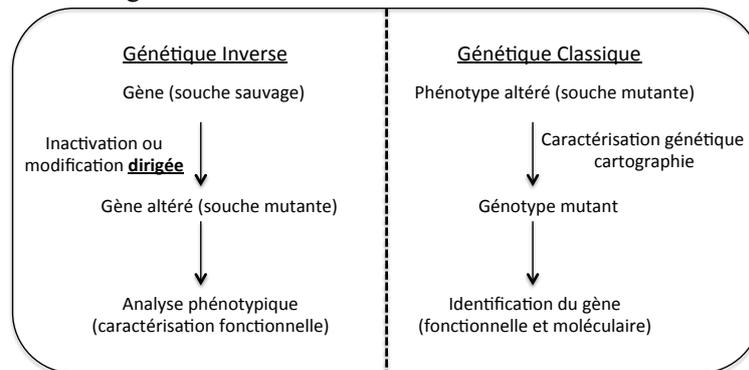
En parallèle, il est indispensable de réaliser un témoin avec un anticorps non relevant (non dirigé contre la protéine d'intérêt) afin de s'affranchir de toute liaison aspécifique éventuelle entre la protéine d'intérêt et les billes.

3) Génétique inverse : Création de mutant par délétion ou inactivation par insertion

Le développement des techniques de biologie moléculaire et le séquençage des génomes ont permis d'ajouter à la génétique classique ce qu'on qualifie de génétique « inverse ».

En génétique classique, on part de l'isolement et l'observation d'un phénotype altéré (souche mutante) pour aboutir à l'identification fonctionnelle (voire moléculaire) du gène responsable de cette altération phénotypique, par le biais d'analyses et de cartographies génétiques.

A l'opposé, en génétique inverse, on effectue une modification dirigée d'un gène déjà **identifié** (création ciblée de souche mutante) puis on analyse l'impact phénotypique de cette modification afin d'effectuer une caractérisation fonctionnelle du gène.



La modification dirigée englobe aussi bien l'inactivation du gène par délétion ou insertion que l'introduction de mutations ponctuelles, la création de gènes chimériques (adjonction de déterminant antigénique encore appelé épitope ; changement de promoteur ...).

La méthodologie précise utilisée pour remplacer *in vivo* le gène ciblé par sa version modifiée peut varier d'un organisme à l'autre mais repose sur des principes fondamentaux communs décrits ci-dessous :

I- La construction *in vitro* d'ADN recombinant (ex : gène modifié) à l'aide de techniques de biologie moléculaire de base (PCR, clonage etc.).

II- L'introduction de cet ADN recombinant dans la cellule ou l'organisme à modifier (transformation, transfection).

III- La mobilisation *in vivo* du système de recombinaison permettant l'insertion de la séquence modifiée dans le génome :

Recombinaison homologue (utilisé chez la levure, les bactéries etc.)

Recombinaison transpositionnelle (utilisé chez la drosophile, les plantes)

Recombinaison spécifique de site (ex système CRE-Lox utilisé chez la souris, les plantes)

IV- L'identification des cellules (ou organismes) ayant effectivement subi le remplacement du gène ciblé par sa version modifiée parmi le pool de cellules (ou organismes) de départ par le biais de marqueurs de sélection (marqueurs de résistance à certaines drogues ou marqueurs d'auxotrophie).

Afin d'illustrer les grandes lignes de cette méthodologie, voici comment on procède communément avec l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*. Attention ceci n'est pas applicable à l'ensemble des organismes modèles.

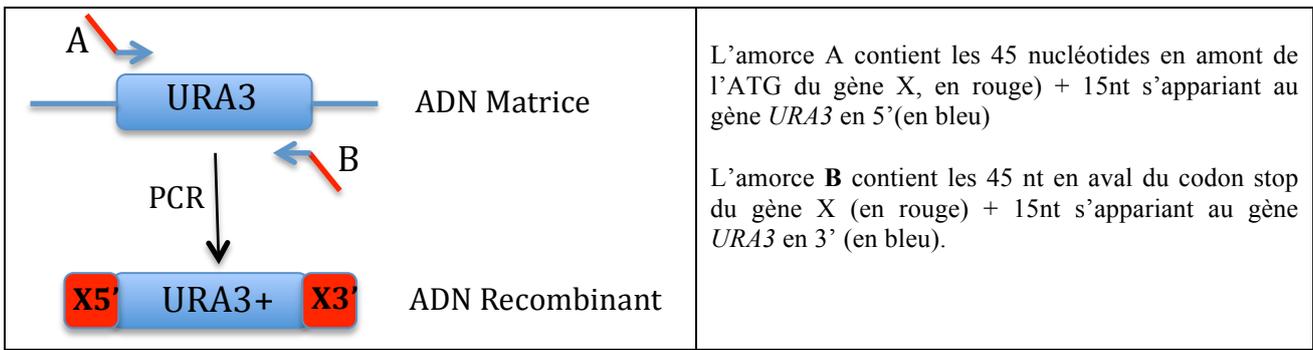
Délétion ciblée d'un gène X chez *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, une région de 45-50 nt d'homologie de séquence entre un ADN exogène et le génome est suffisante pour permettre un événement de recombinaison homologue.

I-construction de l'ADN recombinant par PCR

On dispose d'un ADN matrice contenant la séquence d'un marqueur de sélection, ici l'allèle sauvage du gène *URA3* qui code pour une enzyme de la voie de biosynthèse de l'uracile (ce marqueur de sélection est un marqueur d'auxotrophie) + un couple d'oligonucléotides A et B comme indiqué sur la figure.

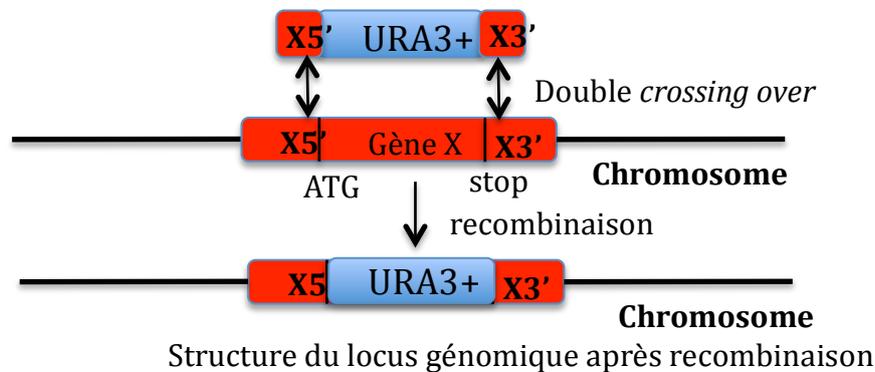
Par PCR on va donc produire un ADN recombinant correspondant au gène *URA3+* flanqué de part et d'autre de séquences de 45pb homologues respectivement aux séquences 5' et 3' du gène X à cibler.



II +III. Transformation et recombinaison.

L'ADN recombinant va être introduit dans une souche de levure de génotype *ura3⁻*, c'est à dire dont le gène *URA3* est non fonctionnel, cette souche sera donc auxotrophe pour l'uracile.

La présence des régions d'homologie entre l'ADN recombinant et le locus génomique du gène X va permettre des événements de recombinaison homologue conduisant à la suite d'un événement de double *crossing over* au remplacement de la phase ouverte de lecture du gène X par le marqueur *URA3⁺*.



IV. Les cellules dans lesquelles cet événement s'est produit vont pouvoir être identifiées (sélectionnées) sur le critère d'acquisition du marqueur *URA3⁺* qui se traduira par une prototrophie pour l'uracile (capacité à croître sur un milieu dépourvu d'uracile).

Une vérification par PCR pourra être faite sur l'ADN génomique de ces cellules afin de confirmer le lieu d'insertion du marqueur et donc la délétion du gène X ciblé. L'absence d'intégration supplémentaire sera confirmée par Southern-blot. Une analyse phénotypique pourra alors être menée sur les souches ainsi obtenues.

Nota Bene : Il peut être nécessaire d'effectuer la transformation sur des souches diploïdes, ce qui permet de récupérer des transformants même lorsque le gène ciblé est essentiel car seule une des deux copies du gène X sera inactivée.

4) Gènes rapporteurs

Les fusions rapporteuses ont pour but notamment d'étudier la régulation de l'expression d'un gène d'intérêt. Celle-ci peut-être transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, traductionnelle ou encore post-traductionnelle.

On qualifie alors une fusion rapporteuse de "transcriptionnelle" lorsque les variations d'expression du gène rapporteur reflètent une régulation transcriptionnelle du gène étudié, ce qui implique que la partie du gène étudié présente dans la fusion soit restreinte exclusivement au promoteur. Autrement dit, la seule fusion pouvant être qualifiée de transcriptionnelle parmi celles représentées ci-dessous est la fusion 3. En toute rigueur, la fusion 2 ne peut pas être qualifiée de transcriptionnelle car elle contient la région 3'-UTR du gène étudié, et celle-ci peut être impliquée dans une régulation post-transcriptionnelle.

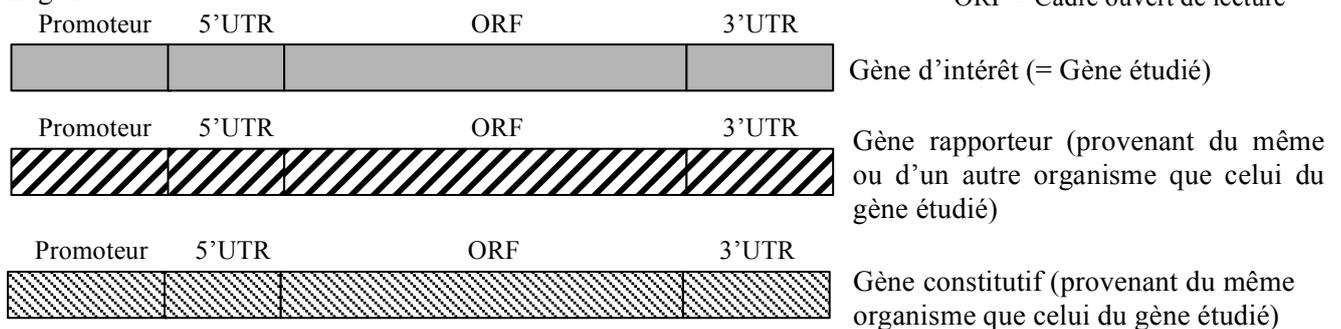
De la même manière, une fusion traductionnelle serait une fusion où les variations d'expression du gène rapporteur refléteraient une régulation traductionnelle du gène étudié. Par conséquent, une telle fusion ne peut exister car elle impliquerait certes que le promoteur de la fusion soit celle d'un gène non régulé, mais que notamment la région 5'-UTR soit celle du gène étudié puisque celle-ci est impliquée dans l'initiation de la traduction (à la fois chez les organismes procaryotes et eucaryotes) (Fusion 4). Or la région 5'-UTR peut également être impliquée dans une régulation post-transcriptionnelle.

En fait, la plupart des fusions que nous utilisons peuvent difficilement être qualifiées car il n'y a en général que l'ORF qui est, totalement ou en partie remplacé par celui du gène rapporteur (Fusion 1), et toute variation de l'expression du gène rapporteur peut être alors due à une régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle ou/et traductionnelle du gène étudié.

Schémas de différentes fusions rapporteuses possibles :

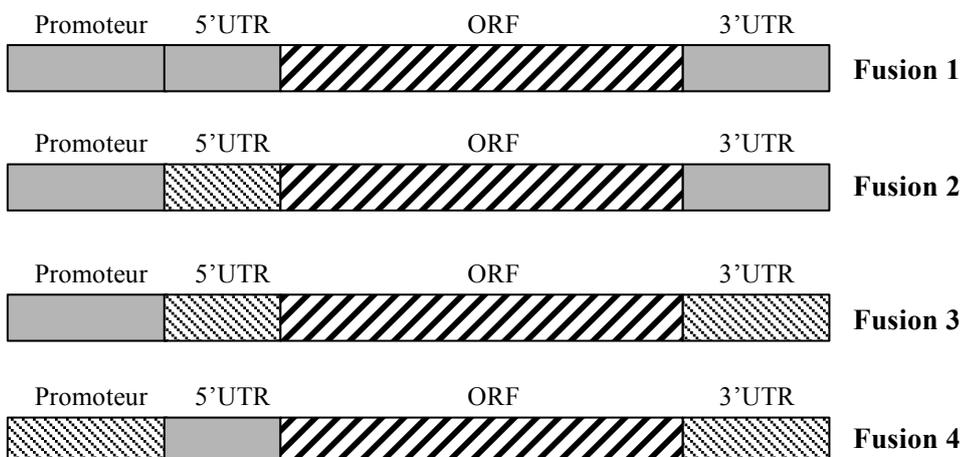
Légende :

ORF = Cadre ouvert de lecture



Attention : ces trois gènes, et leurs différents éléments respectifs n'ont pas forcément la même taille (ils ont été représentés ici de mêmes tailles pour des raisons didactiques)

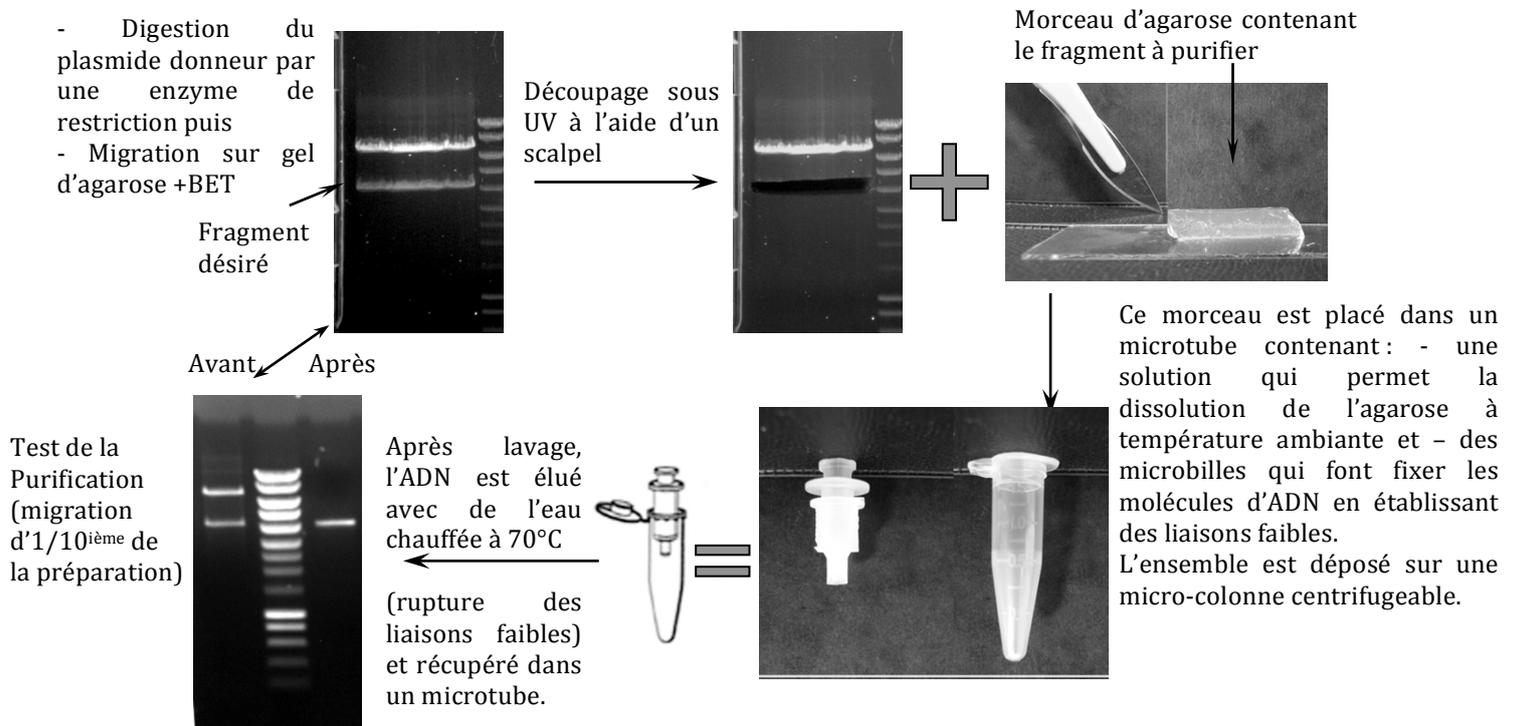
Exemples de quatre fusions possibles (avec des conséquences éventuellement différentes) :



5) Isolement, purification d'un fragment d'ADN et Clonage

Le clonage d'une partie d'un fragment d'ADN (fragment déjà cloné) peut être réalisé de la façon suivante (voir s-ci-dessous). Cette expérience dite « sous-clonage », s'effectue en deux étapes.

A) Purification du fragment à cloner :



Tadaa ! ;-)

B) Ligature et transformation d'*Escherichia coli* :

Mélange en présence de **Ligase** du fragment purifié avec le vecteur pBluescript linéarisé par une enzyme de restriction compatible avec la première (ou identique)

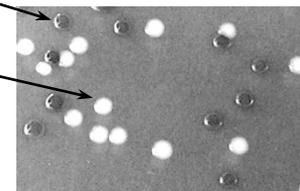
Incubation la nuit à température ambiante

Transformation avec le mélange de ligature d'*E. coli* compétentes

Sélection des transformants sur un milieu contenant de - l'ampicilline* et - du XGAL* Voir explication plus loin.

Colonie bleue = contient un pBluescript natif.

Colonie blanche = contient un pBluescript porteur d'un insert (YOUPI) :-)



Explication du milieu de sélection :

Le rôle de la présence de l'ampicilline dans le milieu est de permettre de sélectionner les bactéries qui ont reçu un plasmide, car le vecteur utilisé porte comme marqueur de sélection un gène de résistance à cet antibiotique. Toute bactérie qui contiendra ce plasmide sera donc capable de se développer et donc de donner naissance à une colonie sur un milieu contenant de l'ampicilline.

Le problème des expériences de clonage est que dans notre mélange de ligation, nous allons trouver deux types de plasmides capables de transformer *E. coli* : - D'une part le vecteur natif, c'est-à-dire un plasmide dépourvu de notre insert, par action de la ligase sur le vecteur seul (ce que nous ne voulons pas). - Et d'autre part, un plasmide pBluescript relié à notre insert, grâce à la ligase (ce que nous voulons). Comment faire le tri ? Les biologistes moléculaires ont trouvé une astuce. Le site de l'enzyme de restriction utilisé pour linéariser le vecteur est situé à l'intérieur d'un gène codant une enzyme (la β -galactosidase) qui peut transformer un composé chimique, le XGAL, en un produit colorant la colonie bactérienne en bleu. Les transformants qui ont reçu le pBluescript natif (sans insert- pas bon) seront donc bleus sur un milieu contenant du XGAL. Par contre, les transformants, qui ont reçu un pBluescript ligaturé avec notre insert (les bons) ne produiront pas l'enzyme, tout simplement parce que notre insert a été placé à l'intérieur du gène codant cet enzyme, ce gène a donc été détruit. Ces transformants ne pourront donc pas transformer le XGAL en produit bleu, ils donneront donc des colonies blanches. On parle ici d'un **crible visuel**.