

VIII- Autres techniques de Biologie moléculaire

L'étude de l'expression des gènes permet d'apprécier le statut dans lequel se trouve la cellule et ses réponses fonctionnelles (mesure de l'abondance des transcrits produits par ce gène à un instant donné). Historiquement, les techniques d'hybridation utilisant sondes (Northern-blot, Southern-blot) sont utilisées, aujourd'hui la biologie moléculaire moderne repose essentiellement sur la PCR.

I. La PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)

- Technique développée en **1985** par Kary Mullis, la PCR permet d'amplifier en un nombre très élevé de copies une séquence particulière d'ADN (quantité suffisante pour être révélée), ce qui facilite grandement son étude et son exploitation.
- Elle nécessite les mêmes facteurs de la réplication : l'ADN matrice, l'ADN polymérase, des amorces (primers), des dNTP, Mg²⁺....

1. Etapes de la PCR

- 1.1. La dénaturation** : s'effectue à une température de 94°C, dite température de dénaturation. À cette température, l'ADN matriciel double brin est dénaturé en ADN simple-brin (rupture des liaisons hydrogènes).
- 1.2. L'hybridation (Annealing)** : s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 70°C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences monocaténares complémentaires de régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel.
- 1.3. L'élongation (extension)** : s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. À 72°C, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la réplication en utilisant les dNTP présents dans le mélange réactionnel. Au cycle suivant, les fragments synthétisés au cycle précédent servent à leur tour de matrice. Il faut compter 20 à 40 cycles pour synthétiser une quantité analysable d'ADN (environ 0,1 microgramme). Chaque cycle voit théoriquement doubler la quantité d'ADN présente au cours du cycle précédent.

1. La PCR quantitative en temps réel (Q-RT-PCR)

La RT-PCR (Reverse transcriptase PCR) permet de faire une PCR classique à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétro transcrit grâce à une transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc).

La Q-RT-PCR couple une RT-PCR à une méthode de quantification fluorescente. La cinétique de quantification est basée sur la détection « en temps réel » d'un **signal fluorescent** dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de produit PCR généré au cours de l'amplification.

Intérêt : mesure de l'expression des gènes

II. Les techniques d'hybridation moléculaire

- **L'hybridation** désigne la formation de duplex (un double brin) entre deux séquences nucléotidiques simples brins, par appariement de bases.
- **Une sonde** est un ADN mono-brin ou ARN de taille variable (oligonucléotide) avec une séquence complémentaire à la séquence à détecter. Les sondes sont utilisées pour détecter des séquences spécifiques grâce à un marquage

VIII- Autres techniques de Biologie moléculaire

froid (**isotope radioactif**) ou un marquage **chaud** (molécule **fluorescente**). En s'hybridant avec sa séquence cible, la sonde permet de la détecter.

1. Le Southern blot

Décrite par E. M. Southern en 1975, elle consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des sondes. Les étapes de la technique :

- Extraction de l'ADN génomique
- Digestion par des enzymes de restriction différentes de l'ADN génomique
- Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse dans un gel d'agarose.
- Dénaturation des fragments d'ADN : par un traitement alcalin (NaOH) du gel d'électrophorèse
- Transfert des fragments monocaténaire du gel d'agarose à un support souple : une membrane en nylon
- La présence d'une séquence particulière est mise en évidence en incubant la membrane dans une solution contenant des **sondes** de la séquence recherchée, elles aussi dénaturées.
- Fixation des fragments monocaténaire d'ADN sur la membrane et hybridation avec la sonde marquée
- Lavage et révélation

Intérêt et application : détection des mutations, identification de gènes (nouvelles souches...)

2. Le northern blot

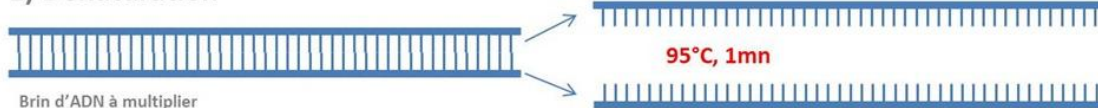
- Elle dérive du Southern blot, sauf qu'au lieu d'étudier de l'ADN, on étudie de l'ARN.
- Une différence du procédé par rapport à la technique de Southern est l'utilisation de formaldéhyde dans le gel d'électrophorèse comme dénaturant, parce que le traitement alcalin d'hydroxyde de sodium utilisé en Southern dégraderait l'ARN.

La procédure : - Extraction d'ARN - électrophorèse –transfert – hybridation – lavage – révélation

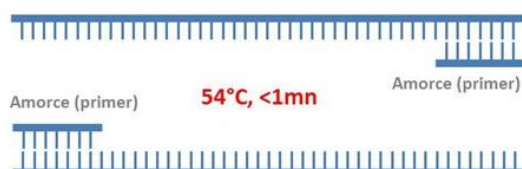
Intérêt et application : mesure quantitative et qualitative de l'expression des gènes.

Etapes de la PCR

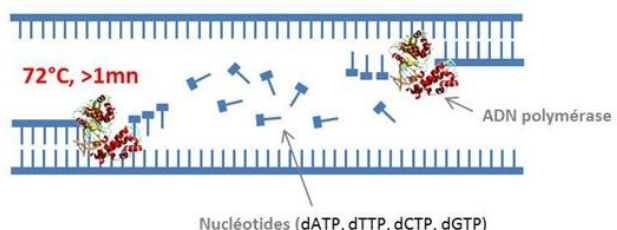
1) Dénaturation



2) Hybridation

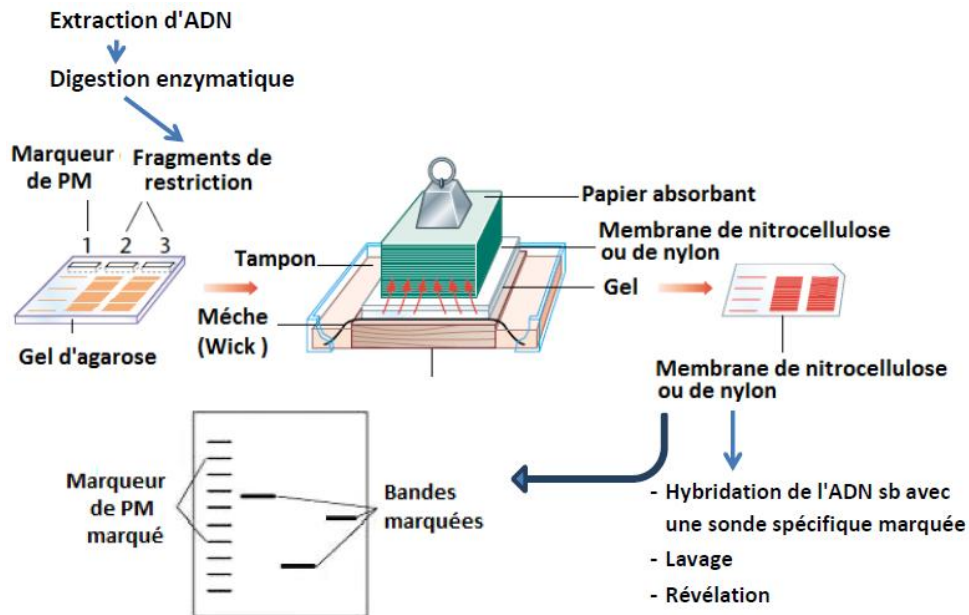


3) Polymérisation



VIII- Autres techniques de Biologie moléculaire

Etapes du Southern blot



Obtention d'ADNc

