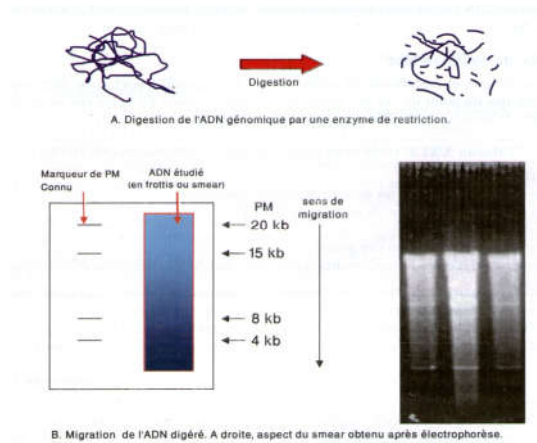


I) HYBRIDATION MOLECULAIRE:

- L'hybridation moléculaire repose sur le principe qu'un fragment **ADN simple brin s'apparie à un autre fragment ADN** en respectant rigoureusement les règles de complémentarité.
- **L'hybridation** est réalisée entre **une sonde dont la séquence est connue** et un segment ADN monobrin obtenu après dénaturation.
- Sous l'effet de la chaleur les liaisons hydrogène de l'ADN double brin s'ouvrent et les deux brins se séparent.
- La température à laquelle **50% des molécule d'ADN sont séparées: température de fusion ou Tm** (melting température)
- Si on **réduit la température**, la double **hélice se reforme** et la structure double brin de la molécule d'ADN est restaurée.
- En fait n'importe quelle paire de deux molécules simple brin d'Ac nucléique double brin est capable de former une molécule double brin aussi longue que leurs bases sont majoritairement complémentaires.
- La molécule double brin est appelée un hybride.
- Des **hybrides peuvent se former entre deux brins** d'ADN, entre un brin d'ADN et un brin d'ARN ou entre deux brins d'ARN.
- Cette propriété des Ac nucléiques est utilisée dans une série de techniques analytique dans lesquelles un ADN ou un ARN spécifique au sein d'un mélange complexe est détecté grâce à un Ac aminé de séquence complémentaire.

II) SONDAS MOLECULAIRES :

- Les sondes constituent le moyen de **détection des séquences recherchées**.
- Une sonde est une séquence nucléotidique **simple brin**, longue de quelques dizaines de pb (oligsonde) à quelques Kb.
- La sonde est capable de **s'hybrider avec une séquence nucléotidique spécifique** présente dans un mélange complexe d'Ac nucléique. Souvent les sondes sont des gènes ou des fragments de gènes, **pouvant être un ARN ou une séquence d'ADN**.
- Les sondes sont **visualisées grâce à un marquage radioactif, enzymatique ou fluorescent**.



Southern blot: (1975)

- Elle correspond au transfert de fragments d'ADN d'un gel à une membrane, ce qui permet l'immobilisation et l'étude de ces fragments d'ADN.
- Après extraction, l'ADN est digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction. L'ADN est coupé en plusieurs fragments de tailles différentes. Les fragments obtenus sont séparés sur un gel d'agarose.
- Après addition de bromure d'éthylum et trans illumination par une lumière UV, les fragments d'ADN sont visible sous forme de frottis ou smear.

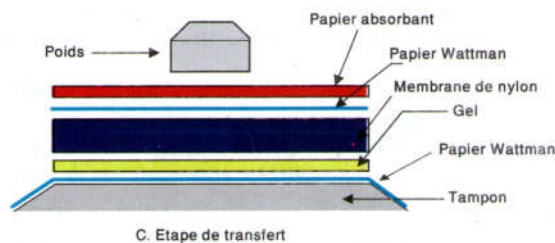
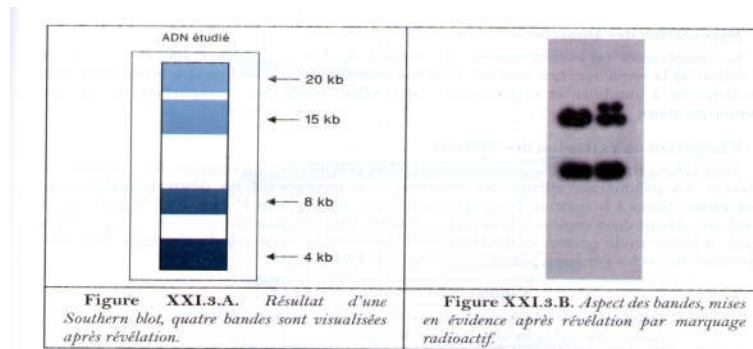


Figure XXI.2. Réalisation pratique d'une technique de Southern.

- Après cette opération, le gel est dénaturé par la soude (NaOH), puis hybridé.
- On obtient des segments ADN plus petits et simples brins.
- On procède alors au transfert par capillarité sur une membrane en nitrocellulose.
- La membrane récupérée, subit une pré hybridation afin de saturer les sites non spécifiques de la sonde. On ajoute ensuite la sonde. Celle-ci s'hybride à sa cible.
- Les séquences d'ADN recherchées apparaissent sous formes de plusieurs bandes, après révélation.



III) METHODES DE GENIE GENETIQUE:

- La réaction de polymérisation en chaîne : Polymerase Chain Réaction (PCR).
- Le séquençage de l'ADN.
- Polymorphisme des longueurs des fragments de restriction (RFLP).

A. Polymerase Chain Reaction (PCR):

- La méthode d'amplification génique in vitro, a été décrite par K 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'Ac 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.

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.

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'hybrident 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'Ac nucléique simple. L'amorce initie la synthèse d'un brin complémentaire, en présence d'une polymérase appropriée.

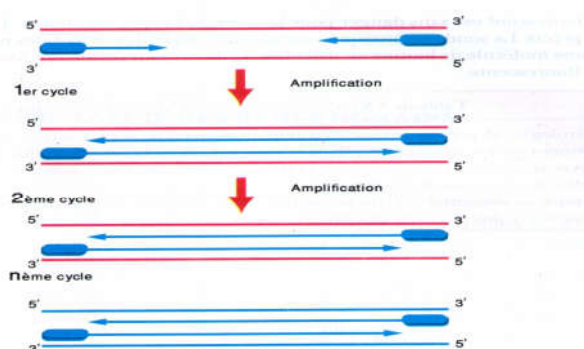
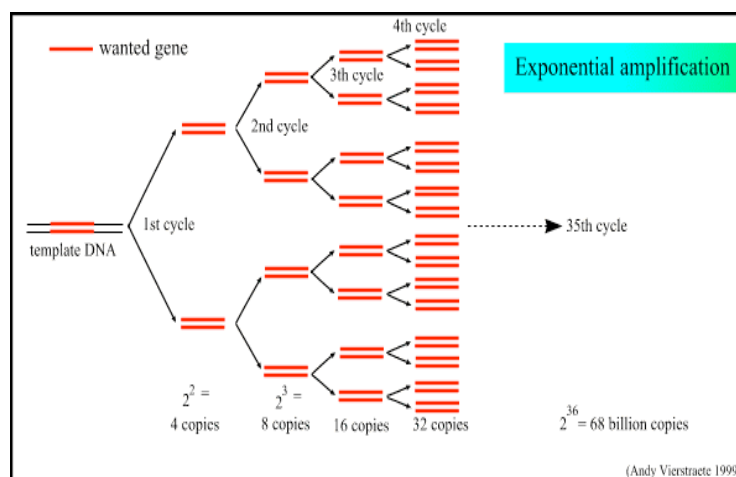


Figure 4. Principe d'amplification des acides nucléiques par la méthode PCR.

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 2^{30} copies de L'ADN cible.

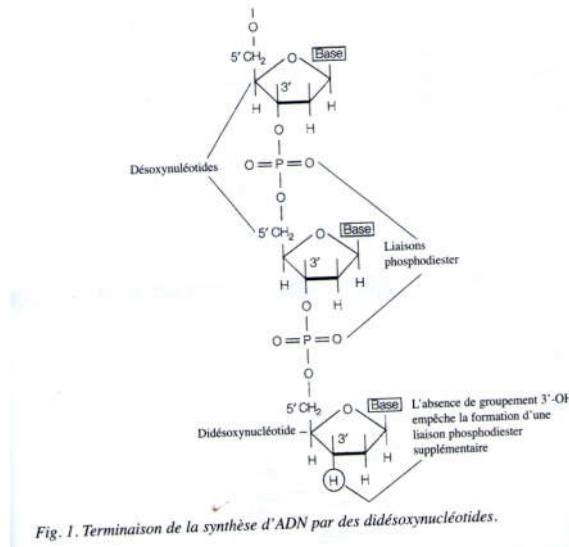
**Intérêt de la PCR:**

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

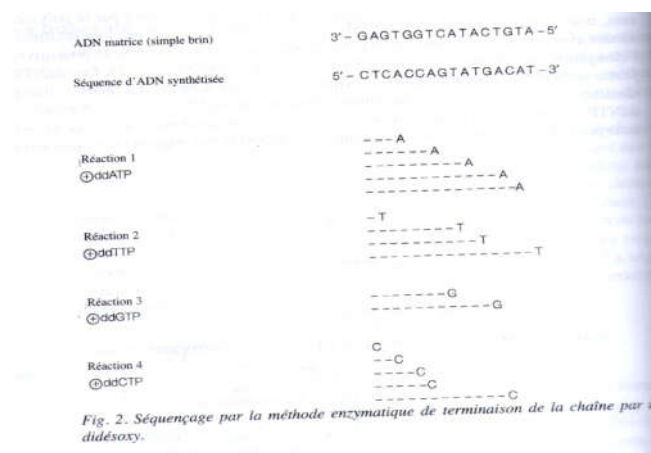
B. Le séquençage de l'ADN:**La méthode de Sanger, de terminaison des chaînes par un didesoxy:**

- consiste à obtenir des copies de 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.



- Exp: 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.

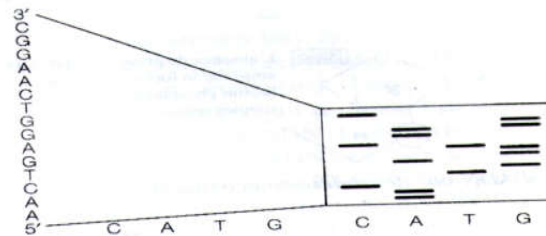


Fig. 3. Motif en échelle obtenu après séquençage d'ADN et électrophorèse.

- Si on ajoute des dNTP contenant du phosphore ou du soufre radioactif dans les préparations de séquençage, les ADN synthétisés deviennent radioactifs 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.