

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

HYBRIDATION MOLECULAIRE , SONDAS, ENZYMES
ET VECTEURS

Elaboré par :
Dr KEBIR .S
Maître assistant
Histologie-Embryologie et Génétique

Année universitaire : 2019-2020

HYBRIDATION MOLECULAIRE, SONDAS, ENZYMES ET VECTEURS

I. HYBRIDATION MOLECULAIRE :

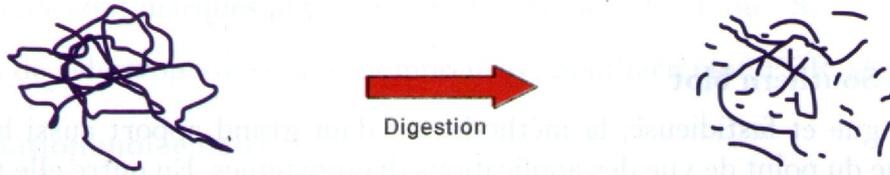
- L'hybridation moléculaire repose sur le principe qu'un fragment ADN simple brin s'apparie à un autre fragment ADN en respectant rigoureusement les règles de complémentarité.
- **L'hybridation** est réalisée entre une sonde dont la séquence est connue et un segment ADN monobrin obtenu après dénaturation.
- 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 molécules d'ADN sont séparées: température de fusion ou T_m (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'acide 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 acides nucléiques est utilisée dans une série de techniques analytiques dans lesquelles un ADN ou un ARN spécifique au sein d'un mélange complexe est détecté grâce à un acide aminé de séquence complémentaire.
- 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 acides nucléiques est utilisée dans une série de techniques analytiques dans lesquelles un ADN ou un ARN spécifique au sein d'un mélange complexe est détecté grâce à un acide aminé de séquence complémentaire.

II. LES SONDAS MOLECULAIRES :

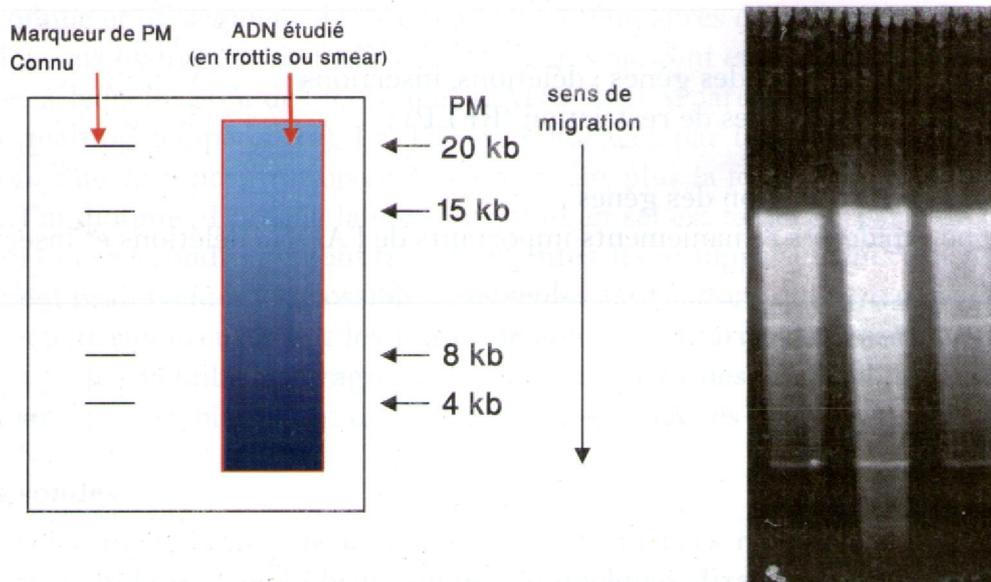
- Les sondes constituent le moyen de détection des séquences recherchées.
- Une sonde est une séquence nucléotidique simple brin, longue de quelque 10aines de pb (oligoprobe) à quelques Kb.
- La sonde est capable de s'hybrider avec une séquence nucléotidique spécifique présente dans un mélange complexe 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.



A. Digestion de l'ADN génomique par une enzyme de restriction.



B. Migration de l'ADN digéré. A droite, aspect du smear obtenu après électrophorèse.

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'éthylidium et transillumination par une lumière UV, les fragments d'ADN sont visible sous forme de frottis ou smear.
- 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.

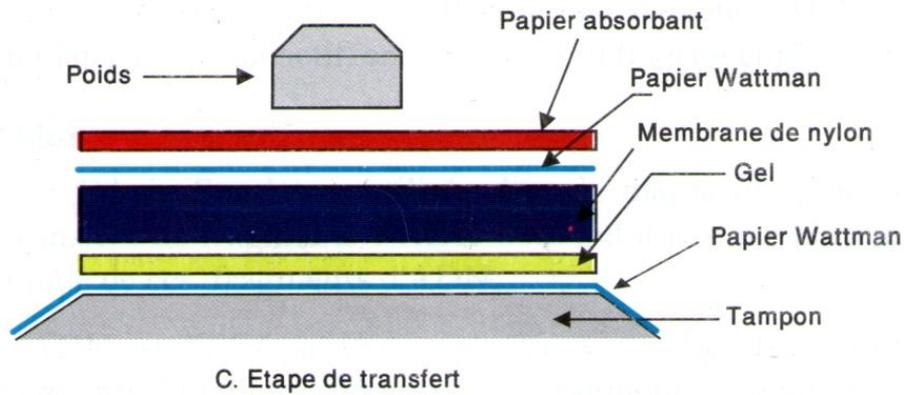
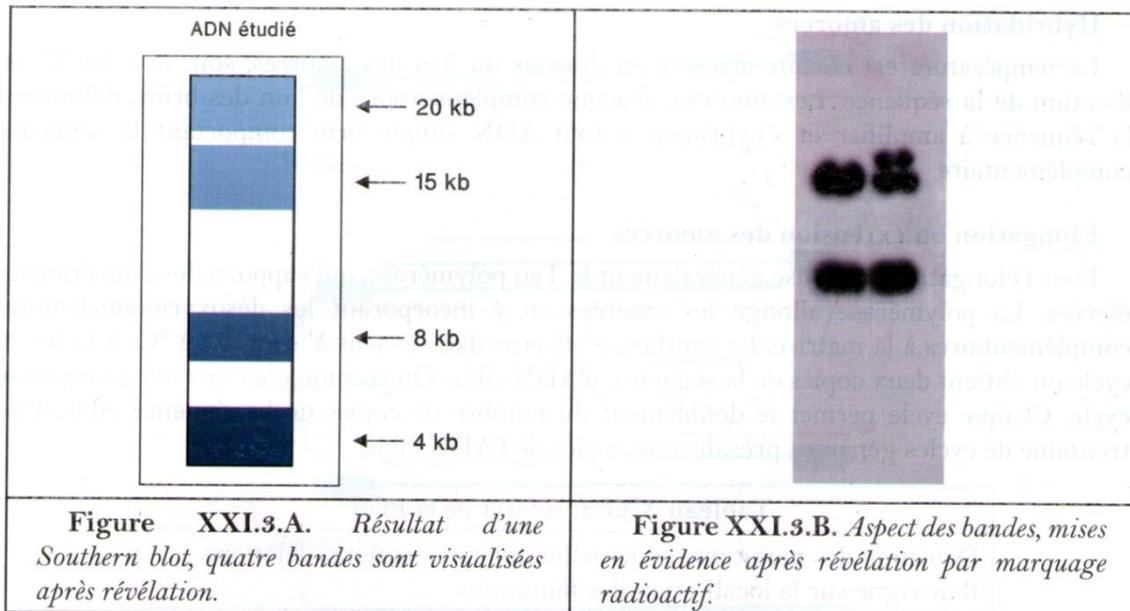


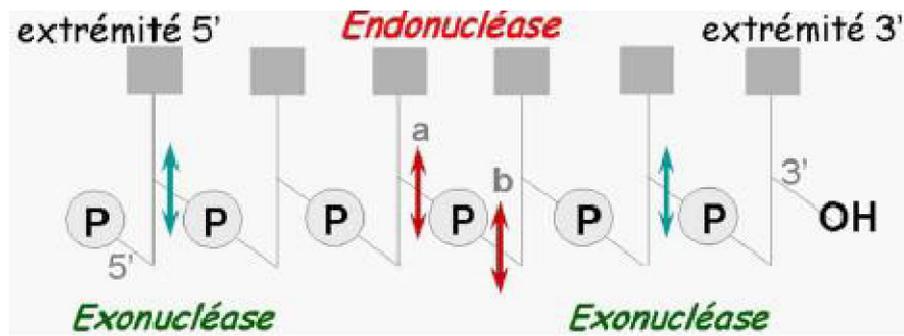
Figure XXI.2. Réalisation pratique d'une technique de Southern.



III. LES ENZYMES

A. LES NUCLEASES :

- Les nucléases dégradent les molécules d'ADN en rompant les liaisons phosphodiester liant un nucléotide au suivant.
- Il existe 2 types de nucléases :
 - Les **exonucléases** coupent aux extrémités.
 - Les **endonucléases** coupent des liaisons internes.



1. **EXONUCLEASES** : Ces enzymes éliminent des nucléotides un à un à partir d'une extrémité de l'ADN. Dans le sens 5' vers 3' ou l'inverse.
Exemple: Exonucléase III catalyse l'hydrolyse séquentielle des nucléotides d'un ADN à partir d'une extrémité 3' libre (dans le sens 3' vers 5').
2. **ENDONUCLEASES** : Ces enzymes sont capables de rompre des liaisons phosphodiester internes
 - La **DNase** extraite du pancréas, coupe préférentiellement après une base pyrimidique.
 - La **nucléase S1** isolée d'un champignon (*Aspergillus oryzae*) dégrade seulement les acides nucléiques monocaténares.

LES ENZYMES DE RESTRICTION:

a. Définition:

- Ce sont des enzymes, principalement d'origine bactérienne, capables de couper l'ADN double brin (et ce quelque soit son origine) à des endroits spécifiques (séquences nucléotidiques) appelés **sites de restriction** généralement de 4 à 6 paires de bases.
- Ces enzymes protègent les bactéries contre l'invasion par de l'ADN étranger qu'elles coupent en petits morceaux.
- Le phénomène de restriction a été observé bien avant que les enzymes de restriction ne fussent mises en évidence. En effet, lorsqu'un bactériophage colonise une bactérie, le phénomène de lyse bactérienne, après multiplication du phage par le biais de la machinerie enzymatique de la bactérie hôte peut ne pas avoir lieu.
- Ceci est expliqué par le fait que :

- l'ADN phagique est intégré, sous forme silencieuse, dans celui de la bactérie : cycle lysogénique.
- l'ADN phagique est complètement détruit (hydrolysé) par les enzymes de la bactérie hôte : les enzymes de restriction (Werner Arber).

b. Nomenclature des enzymes de restriction:

- La première lettre, en majuscule, représente l'initiale du genre bactérien.
- Les deux lettres, minuscules, qui suivent la première sont représentatives de l'espèce.
- Le chiffre romain qui suit ces trois lettres est le numéro d'ordre de découverte de l'enzyme pour la même bactérie source.
- La dernière lettre majuscule n'est pas obligatoire pour toutes les endonucléases de restriction. Elle est représentative de la souche de la bactérie d'où l'enzyme a été isolée.

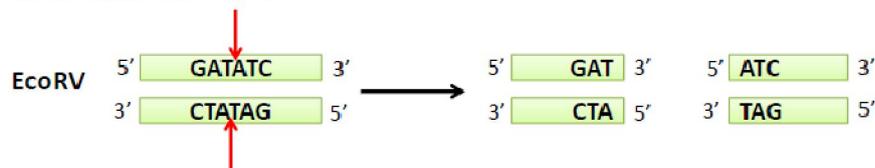


- Exemple :
Escherichia coli Ry13 : Eco R I (1^{ière} enzyme trouvée chez E coli), Eco R V (5^{ème} enzyme trouvée chez E coli)
Providencia Stuartii : Pst I

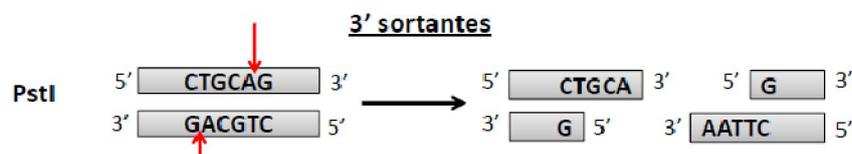
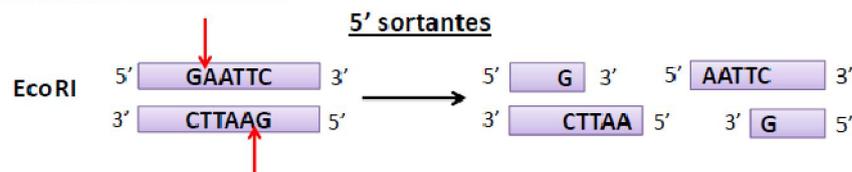
Enzyme	Organism from which derived	Target sequence (cut at *) 5' -->3'
<i>Ava</i> I	<i>Anabaena variabilis</i>	C* C/T C G A/G G
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G* G A T C C
<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigii</i>	A* G A T C T
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli RY 13</i>	G* A A T T C
<i>Eco</i> RII	<i>Escherichia coli R245</i>	* C C A/T G G
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	G G * C C
<i>Hha</i> I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	G C G * C
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	A* A G C T T
<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainflenzae</i>	G T T * A A C
<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G G T A C * C
<i>Mbo</i> I	<i>Moraxella bovis</i>	*G A T C
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	C T G C A * G
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	C C C * G G G
<i>Sst</i> I	<i>Streptomyces stanford</i>	G A G C T * C
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus G</i>	G * T C G A C
<i>Taq</i> I	<i>Thermophilus aquaticus</i>	T * C G A
<i>Xma</i> I	<i>Xanthamonas malvacearum</i>	C * C C G G G

- Les enzymes de restriction peuvent couper en faisant des extrémités franches (même taille d'ADN sur chaque brin), ou des extrémités cohésives (5'sortantes, ou 3'sortantes).

- Extrémités franches



- Extrémités cohésives



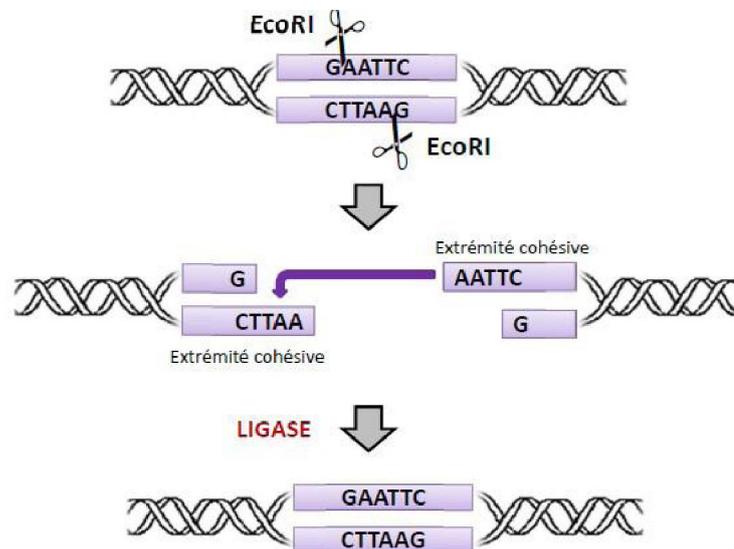
- À quoi servent les enzymes de restriction?
 - À couper l'ADN à des séquences spécifiques.
 - Créent des extrémités, pouvant s'apparier et être reliés par la ligase.

B. LIGASE :

Il est possible d'assembler deux fragments d'ADN avec l'utilisation d'une ligase.

Catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre deux segments d'ADN.

- **ADN ligase** : L'enzyme n'agit que si les 2 ADN sont associés par des extrémités cohésives.
- **T4 ADN ligase** : Elle est capable d'effectuer des ligations entre 2 ADN à bouts francs.
Exemple: Insérer une séquence d'ADN dans un plasmide pour générer un vecteur d'expression.



C. LES ENZYMES MODIFIANT L'ADN:

De nombreuses enzymes modifient l'ADN par addition ou suppression de groupes chimiques spécifiques.

1-Les phosphatases :

- Catalysent l'élimination d'un groupement phosphate en 5'.Empêchant donc la formation de liaison phosphodiester (empêche toute action des ligases).

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

2-les kinases :

- Les kinases permettent le transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP.

- Il s'agit du phosphate en position gamma (le plus externe des trois groupements fixés sur l'Adénosine). Il sera transféré à l'extrémité 5' d'un ADN déphosphorylé.

D. LES POLYMERASES ET ENZYMES APPARENTÉES

- Les polymérase d'acides nucléiques sont des enzymes qui synthétisent un nouveau brin d'ADN complémentaire à une matrice d'ADN ou ARN, s'effectue de manière complémentaire et antiparallèle.
- L'addition des nouveaux nucléotides se faisant dans le sens 5' P vers 3' OH.

1. L'ADN polymérase I :

- Extraite d'*Escherichia coli*, elle joue un rôle majeur dans la réparation de l'ADN.
- Est constituée d'une seule chaîne peptidique et possède trois activités enzymatiques:
 - Une activité de synthèse ADN polymérase 5'-3';
 - Une activité de dégradation exonucléase 3'-5';
 - Une activité de dégradation exonucléase 5'-3'.

2. L'enzyme de Klenow :

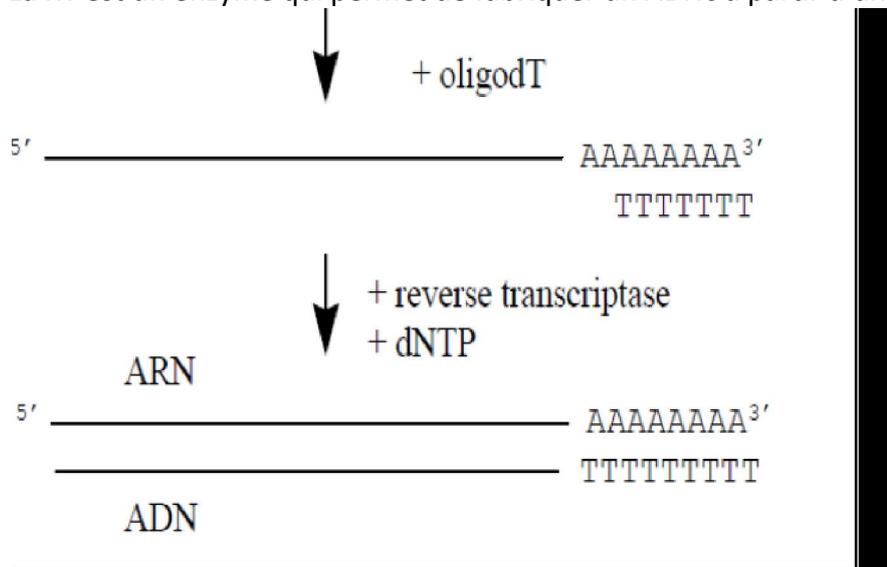
- Enzyme obtenue à partir de l'ADN polymérase I d'où l'on a éliminé le petit fragment responsable de l'activité exonucléase 5'-3'.
- Il ne reste donc plus que les activités polymérase 5'-3' et exonucléase 3'-5'.

3. Les ADN polymérase thermorésistantes

- **La Taq polymérase** : C'est une ADN polymérase isolée des bactéries vivant dans les sources d'eau chaude. Elle agit à une température voisine de 65°C.

4. La rétrotranscriptase (ou transcriptase reverse):

- Codée par les gènes pol des rétrovirus.
- La RT est un enzyme qui permet de fabriquer un ADNc à partir d'un ARNm.



IV. LES VECTEURS :

- Un vecteur est un **transporteur** capable de conduire une molécule à **pénétrer** dans une cellule.
- En biologie moléculaire, certains vecteurs sont étudiés pour faire **entrer un acide nucléique** dans une cellule et permettre la **réplication** ou **l'expression** de cet acide nucléique dans la cellule qui le reçoit.
- Les plasmides bactériens, les bactériophages et de nombreux virus sont des vecteurs naturels.
- D'autres vecteurs encore plus performants sont été obtenus artificiellement à partir de ceux-là grâce à des manipulations génétiques.