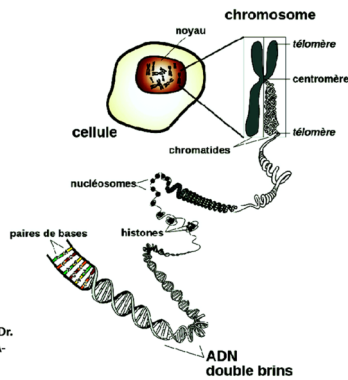
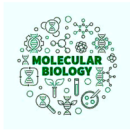


Cours de Biologie Moléculaire



Cours de Biologie
moléculaire réalisé par Dr.
REBAI Redouane (MCA-
Univ-Biskra)

Dr. REBAI Redouane -
Université- Biskra

1.0

13/08/2024

Table des matières

I - Chapitre 05 : Méthodologie et biologie moléculaire	3
1. Objectifs du chapitre	3
2. Introduction	3
3. Préparation de l'ADN génomique (extraction et purification)	3
3.1. La préparation de l'ADN à partir du sang total	3
3.2. Séparation des acides nucléiques: (électrophorèse sur gel d'agarose)	4
3.3. Visualisation et révélation	6
3.4. Quantification des acides nucléiques	6
3.5. Hybridation des acides nucléiques	7
3.6. Réaction de polymérisation en chaînes (PCR)	9
3.7. Séquençage Historique	10
3.8. Le polymorphisme de restriction	13
3.9. Les interactions de l'ADN avec les protéines	14
Bibliographie	16
Webographie	17

I Chapitre 05 :

Méthodologie et biologie moléculaire

1. Objectifs du chapitre

Les compétences ciblées dans ce chapitre sont :

- se familiariser avec les techniques appliquées en biologie moléculaire.
- Diagnostiquer les pathologies liées aux altérations d'ADN.
- Analyser et Interpréter les résultats des techniques étudiées.

2. Introduction

Depuis les années 1960, les chercheurs en biologie moléculaire ont développé des méthodes pour identifier, isoler et manipuler les composants moléculaires dans les cellules, y compris l'ADN, l'ARN et les protéines. L'étude de ces composés repose sur l'utilisation de différentes techniques à l'échelle moléculaire, telles que d'*hybridation moléculaire*, la *réaction de polymérisation en chaîne* (PCR) et le *séquençage* des acides nucléiques.

3. Préparation de l'ADN génomique (extraction et purification)

L'extraction des acides nucléiques est une étape primordiale dans les analyses moléculaires, car toute étude en biologie moléculaire ou génie génétique implique la mise à disposition d'échantillons d'acides nucléiques.

3.1. La préparation de l'ADN à partir du sang total

Le sang est la source la plus utilisée pour extraire l'ADN génomique, ainsi, la plupart des études de routine en médecine, se réfèrent aux leucocytes sanguins qui représentent la source majeure d'ADN.

L'extraction au phénol est une méthode couramment utilisée pour éliminer les protéines d'un échantillon d'ADN, par ex. éliminer les protéines du lysat cellulaire lors de la préparation de l'ADN génomique.

⚙️ *Méthode : Procédure d'isolement et de purification d'ADN*

- 1- Prendre une quantité du sang à raison de 10 ml à 30 ml dans un tube contenant un *anticoagulant* (EDTA).
- 2- Faire éclater les globules rouges du sang par *choc osmotique* en le mélangeant à une *solution hypertonique*.

3- Récupérer des les globules blancs après centrifugation.

4- -Ajouter un mélange de **détergent SDS** et de **protéinase K** ; le détergent détruira les membranes et la protéinase digèrera les protéines associées à l'ADN génomique.

5- Extraire l'ADN des protéines par un mélange **phénol-chloroforme** : le **phénol** procède à la **déprotéinisation** de l'ADN, les protéines dénaturées forment un précipité dans la phase organique tandis que l'ADN reste dans la phase aqueuse et récupéré par centrifugation.

6- Précipiter l'ADN en ajoutant une quantité d'**isopropanol** ou l'**alcool éthylique**.

7- Laver l'ADN par ajout d'**éthanol 70°** ce qui permet d'éliminer les sels, et les traces de l'isopropanol. L'ADN est récupéré par centrifugation.

8- Sécher la molécule d'ADN pour l'élimination de l'éthanol (s'évapore).

Consultez la vidéo sur : <https://images.cnrs.fr/video/2149>.

⊕ Complément : Extraire des ARN totaux

1- L'extraction des ARN totaux est réalisée à partir du sang fraîchement recueilli ou décongelé, le sang doit être initialement et vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges.

2- Les méthodes pour provoquer une lyse des globules rouges sont nombreuses et variées, les cellules peuvent être lysées par des méthodes chimiques (à l'aide de détergents comme le **CTAB**, **SDS**, etc.) enzymatiques (ex. protéinase K, **lysozyme**, **zymolase**, etc.), ou mécaniques (billes de broyage et broyeurs).

3- centrifugation de l'**homogénat** pour éliminer les débris cellulaires.

4- Les ARN peuvent être extraits avec un mélange contenant du phénol, du chloroforme et de l'**isothiocyanate de guanidine**. Lorsque le **pH** est **acide**, les ARN sont dans la phase aqueuse supérieure et les ADN devenant plus solubles sont dans la phase organique inférieure.

5- laver l'ARN dans l'acétate de sodium et précipiter à l'isopropanol.

6- l'ARN peut être conservé plus d'un an soit sous forme précipitée dans l'éthanol, soit sous forme congelée à -80°C.

3.2. Séparation des acides nucléiques: (électrophorèse sur gel d'agarose)

Les applications biotechnologiques à l'échelle moléculaire impliquant l'étude des acides nucléiques tel l'ADN font appel à différentes techniques de séparation et d'analyse. Nous citons, l'électrophorèse sur gel d'agarose qui est la technique la plus communément utilisée pour la séparation des molécules en fonction de leur taille. Cette technique est indispensable dans de multiples applications, notamment pour identifier des fragments d'ADN découpés par des enzymes, pour identifier un gène ou pour établir des empreintes génétiques

Cette technique est couramment utilisée pour la préparation et l'analyse de l'ADN. Ce dernier est chargé négativement parce que les phosphates qui forment le squelette sucre- phosphate d'une molécule d'ADN ont une charge négative. Ainsi, lorsqu'il est placé dans un champ électrique, l'ADN va migrer vers le pôle positif (anode). L'agarose polymérisé est poreux, va permettre le mouvement de l'ADN et la séparation des fragments d'ADN par taille: les molécules de bas poids moléculaire se mouvront plus rapidement que les molécules de poids moléculaire plus élevé, et de ce fait vont migrer plus loin dans le gel. La migration d'une molécule d'ADN linéaire est inversement proportionnelle au logarithme népérien (log) de son poids moléculaire. Des marqueurs moléculaires de masse connue (standards) peuvent être chargés sur le gel pour l'estimation de la masse d'un fragment d'ADN. Pour ça, le log de la taille moléculaire connue des standards doit être tracé en fonction de la distance de migration pour les bandes d'ADN correspondantes. La taille moléculaire d'un fragment d'ADN peut ensuite être estimée à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant sa distance parcourue.

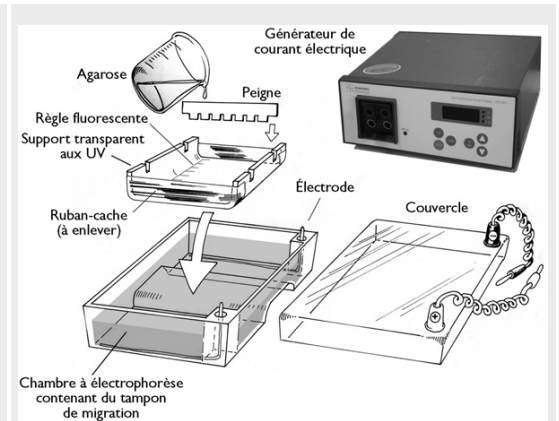


Figure 51: Appareillage de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

⊕ Complément : Procédure

- Préparation du gel

- 1- Mélanger le **tampon** TBE (Tris- Borate-EDTA) et une quantité d'**agarose** à raison de 0,8 g pour 100 ml de tampon (la proportion d'agarose dépend de la taille des molécules d'ADN à séparer, tableau 1).
- 2- Faire fondre l'agarose au four à micro-onde sous surveillance pour éviter les projections ou au bain marie. Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange.
- 3- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (environ 60 °C).
- 4- Insérez les joints inclus dans la cuve pour refermer le support de gel, et positionnez le peigne à environ 1 mm du fond et d'environ 1 cm de sa fin. Opter pour une position horizontale du support de gel. Il y a une cale pour ajuster la hauteur de quelques peignes en utilisant une vis.
- 5- Incorporez progressivement le gel sur une épaisseur de 3 à 5 mm, en veillant à ce qu'il recouvre correctement les dents du peigne.
- 6- Laisser sécher, retirer le peigne ainsi que les joints. Le gel est prêt à être déposé pour les tests.

Tableau 5: Taille des fragments à séparer selon la concentration du gel

% d'agarose	Taille des fragments à séparer en (kb)	% d'acrylamide	Taille des fragments à séparer en (pb)
0,5	1-30	4	200-800
0,7	0,8-12	5	80-200
1	0,5-10	8	40-100
1,2	0,4-7	11	10-50
1,5	0,2-3		

• Dépôt des échantillons et lancement de l'électrophorèse

1. Mélanger le **tampon de charge** (contenant du **bromophénol** et du **glycérol**) et l'ADN dans un tube **Eppendorf** et prélever le mélange avec une **micropipette** réglée sur le volume approprié en changeant de cône à chaque prélèvement.
2. Remplir les puits en veillant à ne pas briser le fond du gel par la pointe de la pipette.
3. Insérer le support avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse, en disposant les puits sur le côté négatif de la cathode.
4. Remplir la cuve contenant le tampon de migration (**TBE**, Tris borate EDTA) en versant lentement et délicatement lorsque le gel se recouvre.
5. Compléter les puits en veillant à ne pas briser le fond du gel par la pointe de la pipette.
6. Déposer 10 µL de l'échantillon de l'ADN, préalablement coloré par le tampon de charge) (2 µL) et éventuellement 10 µL du marqueur de taille moléculaire (DNA Ladeer) qui migre parallèlement à l'ADN étudié.
7. Fermer la cuve et mettre sous tension (100 volt).
8. Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel.
9. Couper l'alimentation, débrancher les connections et récupérer le gel dans son support.

3.3. Visualisation et révélation

La méthode de révélation la plus utilisée repose sur l'utilisation du **bromure d'éthidium** (BET) un **agent intercalant** et **fluorophore** ajouté préalablement au gel d'agarose, se fixe entre les bases et devient **fluorescent** ce qui rend les **bandes** d'ADN visibles lorsqu'il est exposé aux rayons **UV** à l'obscurité.



Figure 52: Visualisation du gel d'électrophorèse sous la lumière UV.

3.4. Quantification des acides nucléiques

Les ADN (double brin, simple brin) ou les ARN purifiés peuvent être quantifiés par spectrophotométrie (NanoDrop par exemple) en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm.

La pureté est évaluée par mesure de l'**absorbance** à $\lambda = 280 \text{ nm}$ et $\lambda = 230 \text{ nm}$. Le ratio des 2λ 260/280 permet de détecter une contamination des acides nucléiques par des protéines. Sa valeur varie entre 1,8 et 2,0 pour de l'ADN et entre 2,0 et 2,2 pour de l'ARN.

3.5. Hybridation des acides nucléiques

L'hybridation est le processus de combinaison de deux molécules d'ADN ou d'ARN simple brin complémentaires leur permettant de former une molécule double brin unique par appariement des bases puriques et pyrimidiques. L'hybridation est utilisée surtout dans la détection de l'homologie entre les molécules d'ADN de sources différentes et fait partie de nombreuses techniques de laboratoire importantes telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et le Southern blot.

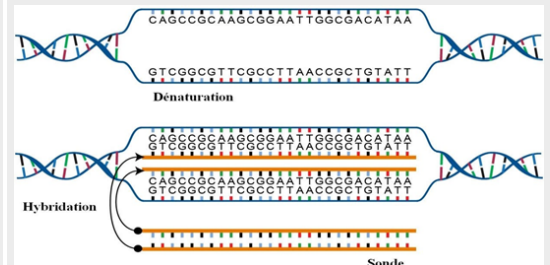


Figure 53: Hybridation des acides nucléiques

3.5.1. Hybridation sur support solide

Dans ce type d'hybridation, la séquence cible est fixée sur un support solide (immobilisation de la cible sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon) pour séparer des fractions hybridées de celles non hybridées.

a. Southern Blot

Cette méthode a d'abord été décrite par E.M. Southern en 1975. Elle implique la détection précise de fragments d'ADN qui sont transférés sur des filtres en les hybridant à des séquences supplémentaires identifiées par un **radio-isotope**.

- La première étape de cette technique commence par l'extraction de l'ADN génomique.
- La molécule d'ADN extraite est digérée par des enzymes de restriction pour obtenir des fragments du gène étudié.
- Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose.
- Après cette séparation, l'ADN bicaténaire va subir une dénaturation par traitement alcalin du gel pour le transformer en ADN monocaténaire.
- Transfert par simple capillarité des fragments d'ADN monocaténaire du gel d'agarose à un support (feuille de nylon ou de nitrocellulose).
- Les fragments monocaténaires d'ADN transférés sur un support solide (nylon) sont mis en présence d'une **sonde marquée** pour s'hybrider. La sonde s'apparie avec les fragments d'ADN monocaténaire selon les règles de complémentarité. De plus, elle est marquée avec un radioisotope à l'extrémité 5', ou l'intérieur de la chaîne polynucléotidique.

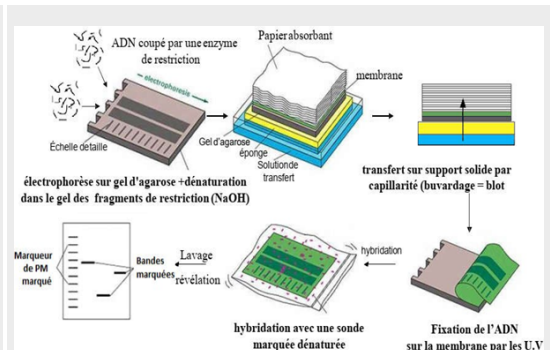


Figure 54: Southern Blot.

Après de nombreuses opérations de lavage pour éliminer les « *sondes non appariées* », le support solide est mis en contact avec un film **autoradiographique** pendant quelques heures à plusieurs jours. Les bandes d'ADN monocaténares hybridées avec la sonde radioactive deviennent visibles.

b. *Hybridation in situ sur chromosome*

Ce type d'hybridation est utilisé pour déterminer la région d'un gène d'intérêt sur un chromosome donné. L'hybridation est réalisée sur un échantillon cytologique préparé au préalable et fixé sur une lame. L'isotope utilisé pour marquer la sonde à hybrider in situ sur le chromosome est le tritium qui est doté d'un rayonnement très court, ce qui donne une localisation fine de la zone émettant la radioactivité. Le résultat est observé sous microscope où les signaux positifs apparaissent sous forme de grains noirs disposés sur les chromosomes.

c. *Hybridation sur colonie de bactéries*

Cette technique a pour objectif de détecter parmi un grand nombre de bactéries ou de phages recombinants celle ou celui qui contient le fragment d'ADN recherché (criblage de banque).

L'ensemble des bactéries est étalé sur une boîte de Pétri pour insérer des fragments d'ADN d'une autre espèce (le plasmide) (clonage), puis les empreintes de chaque boîte seront prises par dépôt d'une membrane (de nitrocellulose ou de nylon) pendant quelques instants. Cette membrane est ensuite transférée dans une solution de soude pour faire éclater les bactéries et dénaturer l'ADN. Après fixation, hybridation et autoradiographie, il est possible de localiser le clone d'intérêt.

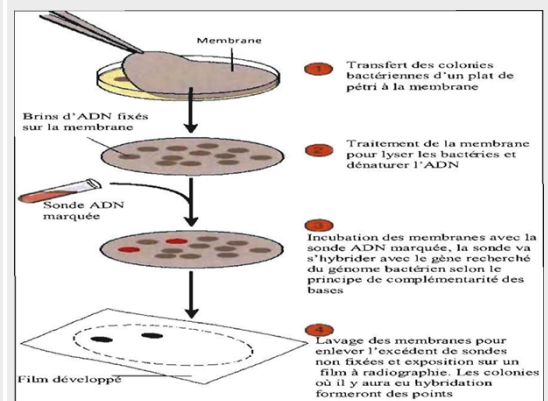


Figure 55: Hybridation sur colonie de bactéries.

3.6. Réaction de polymérisation en chaînes (PCR)

3.6.1. Historique et principe

La technique de PCR est considérée comme l'une des avancées scientifiques les plus importantes en biologie moléculaire, elle a révolutionné l'étude de l'ADN à tel point que son créateur, Kary B. Mullis, a reçu le prix Nobel de chimie en 1993.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique rapide et peu coûteuse utilisée pour amplifier in vitro de petits segments d'ADN d'intérêt. Parce que des quantités importantes d'un échantillon d'ADN sont nécessaires pour les analyses moléculaires et génétiques, les études de morceaux isolés d'ADN sont presque impossibles sans amplification par PCR.

Une fois amplifié, l'ADN produit par PCR peut être utilisé dans de nombreuses procédures de laboratoire différentes. Cette technique a rapidement trouvé de nombreuses applications, car elle est utile dans un certain nombre de techniques de laboratoire et cliniques, y compris la prise d'empreintes ADN, la détection de bactéries ou de virus, en particulier dans le domaine des maladies infectieuses et le diagnostic précoce des infections bactériennes, virales ou fongiques.

3.6.2. Etapes de la PCR

L'amplification exponentielle de l'ADN à étudier met en jeu une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant.

La PCR imite ce qui se passe dans les cellules lorsque l'ADN est copié (répliqué) avant la division cellulaire, sauf que dans ce cas elle est réalisée dans des conditions contrôlées. La machine utilisée est appelée un thermocycleur. Des tubes à essai contenant le mélange d'ADN d'intérêt sont placés dans la machine, où la température est adaptée automatiquement à chaque étape du processus.

Le mélange réactionnel doit impérativement contenir :

- le segment d'ADN d'intérêt
- les amorces spécifiques
- l'enzyme ADN polymérase résistante à la chaleur (*Taq polymérase*)
- les quatre différents types de nucléotides sous forme triphosphates
- les sels nécessaires pour créer un environnement approprié pour que l'enzyme agisse.

La réplication de l'ADN au cours de la réaction de PCR se déroule en 3 étapes :

• **Dénaturation**

Comme dans la réplication de l'ADN, les deux brins de la double hélice d'ADN doivent être séparés. La séparation se produit en augmentant la température du mélange autour de 95 °C, provoquant ainsi la rupture des liaisons hydrogène entre les brins d'ADN complémentaires.

• **Hybridation**

Les amorces se lient aux séquences d'ADN cibles et initient la polymérisation. Cela ne peut se produire qu'une fois que la température de la solution a été abaissée. Une amorce se lie à chaque brin.

• Polymérisation

De nouveaux brins d'ADN sont fabriqués en utilisant les brins d'origine comme modèles. L'enzyme ADN polymérase relie les nucléotides d'ADN libres ensemble. L'enzyme utilisée est souvent la Taq polymérase, une enzyme isolée à l'origine d'une bactérie thermophile appelée *Thermus aquaticus*. L'ordre dans lequel les nucléotides libres sont ajoutés est déterminé par la séquence de nucléotides dans le brin d'ADN d'origine (matrice).

Le résultat d'un cycle de PCR génère deux séquences double brin d'ADN cible, chacune contenant un brin nouvellement fabriqué et le brin d'origine.

Le cycle est répété plusieurs fois (généralement 20 à 30) car la plupart des processus utilisant la PCR nécessitent de grandes quantités d'ADN. Il ne faut que 2 à 3 heures pour obtenir environ un milliard d'exemplaires.

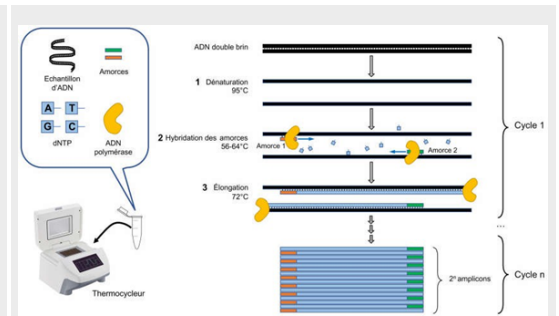


Figure 56: Principe de la PCR (Uhel, et Zafrani, 2019).

3.6.3. Applications

Depuis son introduction dans les années 80, la PCR s'est imposée comme l'outil incontournable utile à un large éventail d'applications, non seulement dans la recherche

fondamentale, mais également dans les domaines du diagnostic médical, de la médecine légale et de l'agriculture. Nous décrivons ici, quelques exemples d'applications de la PCR:

- La **mutagenèse** : l'un des avantages du clonage par PCR est la capacité d'introduire des mutations d'un gène d'intérêt via le clonage moléculaire. Un exemple bien défini est celui rencontré dans la **mutagenèse dirigée**, les amorces de PCR sont conçues pour induire des substitutions de bases, des délétions ou des insertions dans une séquence spécifique, les amorces sont dirigées vers une séquence qui a déjà été clonée dans un plasmide. Le produit de la PCR, contenant la mutation introduite, est ensuite auto-ligaturé pour régénérer un plasmide circulaire et utilisé pour transformer des cellules compétentes.
- **Le génotypage**: la PCR permet de détecter des séquences d'ADN spécifiques présentes dans un produit ou un organisme vivant. Un exemple est le génotypage d'organismes transgéniques tels que les souris knock-out qui sont largement utilisées comme organisme modèle dans la recherche fondamentale pour étudier le rôle des gènes dans le développement, la physiologie et les maladies humaines. La PCR est une méthode de génotypage courante pour détecter la présence ou l'absence du ou des gènes d'intérêt chez les souris transgéniques.
- **Les sciences médicales** : en plus de la recherche fondamentale, les technologies basées sur la PCR sont utilisées chaque jour dans les diagnostics cliniques pour dépister les maladies génétiques (myopathie, mucoviscidose, etc) et infectieuses (SIDA, Hépatite C, SRAS, corona) ou bactériennes (tuberculose) ou parasitaires (toxoplasmose).
- **La médecine légale** : dans l'identification des personnes en utilisant leurs empreintes génétiques (les **microsatellites** ou **STR**), mais aussi pour un test de paternité.

3.7. Séquençage Historique

Les premières techniques de séquençage de l'ADN sont apparues à la fin des années 70, et développées parallèlement, l'une par l'équipe de Walter Gilbert aux Etats-Unis, et l'autre par

Frederick Sanger (la Grande-Bretagne). L'approche de Maxam et Gilbert est une méthode se faisant par dégradation chimique, tandis que celle de Sanger est une méthode usant de synthèse enzymatique sélective. En 1980, Sanger partage le prix Nobel de chimie avec Wally Gilbert et Paul Berg grâce à leur mise au point de ces méthodes pionnières de séquençage de l'ADN. Le premier génome séquencé est celui du virus bactériophage ϕ X174 par la méthode de Sanger en 1977.

L'apparition des techniques d'amplification et de développement des méthodes de production des amorces et des marqueurs fluorescents ont permis d'améliorer considérablement les techniques de séquençage. Le développement des séquenceurs automatiques a notamment permis l'automatisation de ces technologies et a contribué à la finalisation du génotypage humain en 2003.

Actuellement la technique de séquençage repose majoritairement sur la méthode enzymatique de **Sanger**. Elle demeure la méthode la plus utilisée, en dépit du développement des méthodes automatisées plus rapides et moins coûteuses.

Pour que le séquençage se fasse, des éléments de synthèse doivent être présents dans le tube à essai :

- La molécule d'ADN à séquencer : le plus souvent sous forme double brin, mais c'est le brin matrice qui sera séquencé
- L'ADN polymérase qui synthétise la chaîne du brin complémentaire à celle du brin matrice à partir des nucléotides présents dans le milieu.
- Les nucléotides sous forme de désoxynucléotides, sont les bases de l'ADN (A, C, G ou T).
- Les didésoxynucléotides (ddNTP) qui sont le plus souvent marqués et privés du groupement OH en position 3', leur incorporation dans la chaîne de l'ADN provoque l'arrêt définitif de sa synthèse.
- L'amorce qui s'hybride avec une séquence complémentaire.

La **méthode Sanger** est une méthode de séquençage d'ADN, basée sur l'incorporation sélective de didésoxynucléotides pour terminer la chaîne en élongation par l'ADN polymérase, ainsi cette méthode repose sur une amorce qui se lie à une molécule d'ADN dénaturée et initie la synthèse d'un polynucléotide simple brin en présence d'une enzyme ADN polymérase, en utilisant l'ADN dénaturé comme matrice. Dans la plupart des cas, l'enzyme catalyse l'ajout d'un nucléotide. Une liaison covalente se forme donc entre l'atome de carbone 3' de

la molécule de sucre désoxyribose dans un nucléotide et l'atome de carbone 5' du suivant (fig.57).

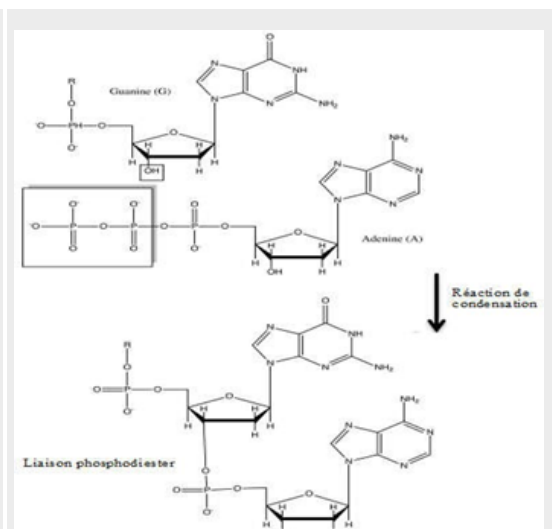


Figure 57: Formation d'une liaison phosphodiester (réaction de polymérisation).

Les fragments d'ADN synthétisés vont être séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ceci permet d'obtenir des bandes colorées successives, chacune correspondant au dernier nucléotide incorporé. Il suffit de lire la succession des couleurs pour connaître l'ordre des nucléotides (fig. 58).

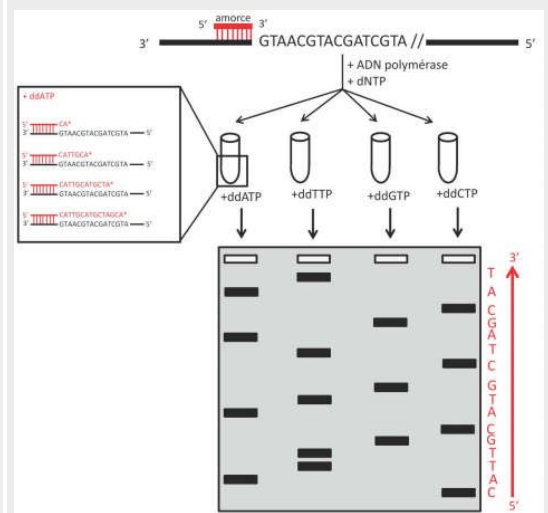


Figure 58: Principe du séquençage selon la méthode de Sanger (Bruto, 2010).

3.8. Le polymorphisme de restriction

3.8.1. Définition

Le **polymorphisme génétique** correspond aux différences génétiques héritées parmi des personnes dans plus de 1% de la population normale. La technique de **PLFR (Restriction Fragments Length Polymorphism)** exploite ces différences dans les séquences d'ADN pour identifier et étudier la variation entre les individus de la même espèce.

*

3.8.2. Applications de RLFP

La technique a été utilisée dans de nombreuses applications d'analyse génétique depuis son invention. A titre d'exemple, elle est devenue l'outil par excellence pour :

- Analyser les maladies génétiques: Après identification du gène d'une maladie génétique ou héréditaire particulière, ce gène peut être analysé parmi d'autres membres de la famille.
- Détecter un gène muté.
- Déterminer ou confirmer la source d'un échantillon d'ADN comme dans des tests ou des enquêtes criminelles et dans les tests de paternité.
- Utiliser comme marqueur sur les cartes génétiques pour l'identification et la différenciation des organismes.

3.8.3. Principe

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction est basé sur deux techniques largement utilisées en biologie moléculaire:

- La digestion par des endonucléases de restriction de l'ADN.
- Le transfert de fragments d'ADN sur une membrane, sur laquelle peut ensuite être hybridé avec un fragment d'ADN marqué (une sonde).

Les endonucléases de restriction reconnaissent et coupent des motifs nucléotidiques spécifiques (sites de restriction) dans une séquence d'ADN (les enzymes couramment utilisées pour l'analyse RFLP reconnaissent des séquences de 4 à 6 paires de bases).

Les fragments d'ADN ainsi obtenus, appelés fragments de restriction, sont séparés selon leur longueur par électrophorèse sur gel d'agarose. Ce dernier est placé dans une solution de NaOH pour la dénaturation, de sorte que de l'ADN simple brin se forme.

- Les fragments seront ensuite transférés sous forme dénaturée sur une membrane de nylon qui est incubée dans une solution contenant des sondes marquées préalablement et les fragments d'ADN vont s'hybrider, ensuite révélés par contact avec un film sensible à la radioactivité (fig. 59).

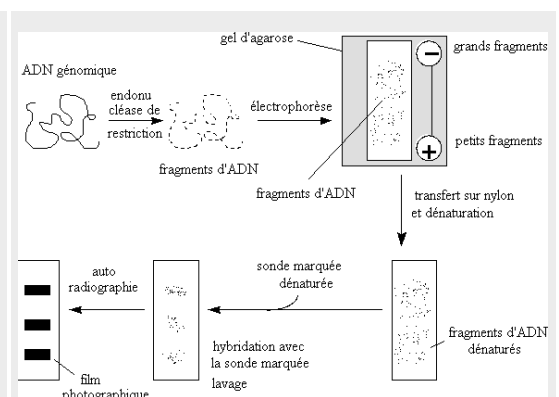


Figure 59: Etapes de la technique RLFP.

3.9. Les interactions de l'ADN avec les protéines

Les interactions de type protéine-ADN sont des composants essentiels à tous les systèmes biologiques et fondamentaux mis en jeu dans presque tous les processus biologiques. De telles interactions contrôlent divers processus cellulaires tels la recombinaison, la réplication et la transcription.

De nombreuses classes d'interactions entre l'ADN et les protéines peuvent exister:

- Protéines-ADN simple brin, par exemple les protéines **SSB** (single-strand binding protein) qui sont impliquées dans le mécanisme de réplication.
- Protéines - ARN simple brin (par exemple le ribosome).
- Protéines - ARN double brin (par exemple, amino acyl ARNt synthétase).
- Protéines-ADN double brin.

Ces types d'interactions protéines-ADN mettent en jeu des liaisons d'hydrogènes, des forces de Van der Waals, électrostatiques et hydrophobes.

Plusieurs protéines, telles que les facteurs de transcription, les ribosomes et d'autres protéines de liaison à l'ADN /peuvent se lier à des séquences d'acide nucléique et influencer la réplication, la transcription et la traduction de l'ADN.

3.9.1. Interaction protéine-ADN au cours de la transcription

La régulation de la transcription des gènes implique, dans toutes les cellules vivantes, des interactions entre l'ADN des séquences régulatrices et des protéines qui contrôlent, la fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur.

- Les facteurs de transcription chez les eucaryotes dont un grand nombre ne se fixent pas à l'ADN mais font partie du complexe de pré-initiation qui interagit directement avec l'ARN polymérase II (fig. 60).

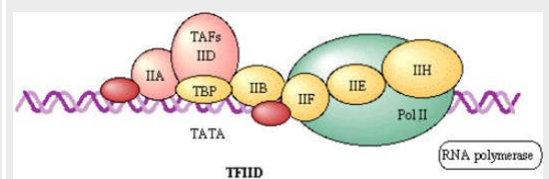


Figure 60: Fixation de facteurs de transcription sur l'ARN polymérase.

- Régulation de l'expression impliquant des récepteurs nucléaires qui se comportent eux mêmes comme des facteurs transcriptionnels. La structure dimérique des ces récepteurs leur permet de se fixer sur des séquences spécifiques situées dans les régions régulatrices des gènes cibles qu'ils activent en présence du ligand qui sont le plus souvent des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes (fig. 61).

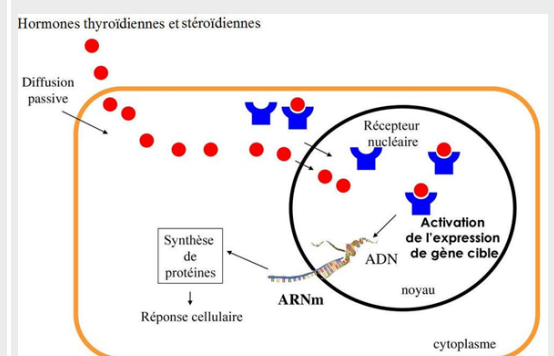


Figure 61: Interaction des récepteurs nucléaires avec l'ADN.

3.9.2. Interaction protéine-ADN au cours de la régulation de la transcription chez les procaryotes

L'activité du promoteur qui contrôle l'expression de l'opéron lactose est régulée par deux protéines différentes. L'une (le répresseur) empêche la transcription de l'ARN polymérase (contrôle négatif), l'autre (protéines CAP) améliore la liaison de l'ARN polymérase au promoteur (contrôle positif) (voir le cours d'expression des gènes et régulation).

Bibliographie

Benmohamed, A. (2017). La réplication chez les eucaryotes et les procaryotes. Cours en ligne. Site : <https://sienceduvivant.wordpress.com/2017/01/07/replication-chez-les-procaryotes-et-eucaryotes/>. Consulté le 20/08/2020.

- Bruto, M. (2010). Etude de la plasticité génomique chez *Streptomyces ambofaciens* : Assemblage et analyse comparative du génome des souches ATCC23877 et DSM40697 Mémoire de master. Université Henri Poincaré Nancy 1. P23.

Cheriyedath, S. (2020). Technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction. Cours en ligne. Site Web (<https://www.news-medical.net/life-sciences>), consulté le 19/12/2020.

Etienne, J et (2004). Biochimie génétique Biologie moléculaire. Masson. ISBN: 2294004477, 9782294004476. 431p.

Fanning, E., & Zhao, K. (2009). SV40 DNA replication: from the A gene to a nanomachine. *Virology*, 384(2), 352-359.

Finn, K., Lowndes, N.F., Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci* 69 : 1447-1473.

Housset, C., Raisonnier, A. (2009). Cours de biologie moléculaire. Faculté de médecine. Université Pierre et Marie Curie. 207p.

Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. (2003). *Molecular Cell Biology*. 6th Ed. 937p.

Morange, M. (2013). Histoire de la biologie moléculaire. La Découverte. ISBN : 2707172596, 9782707172594. 378 p.

Moussard, C., Mougin, C. (2005). Biologie moléculaire. Biochimie des communications cellulaires. De Boeck Supérieur. ISBN : 2804134881, 9782804134884. 311 p.

Webographie

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-21/2111.jpg>.

http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/polymorphisme/rflp.html.

<https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/prokaryotictranscription/>.

- <https://www.bio-top.net/Terminologie/R/index.php?page=ribo>.

<http://planet-vie.ens.fr/article/1482/transcription-eucaryotes>.